



Universidade Federal
de Campina Grande

**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

VALÉRIA MEDEIROS DE MENDONÇA COSTA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA NO
ESTADO DA PARAÍBA**

**PATOS-PB
2013**

VALÉRIA MEDEIROS DE MENDONÇA COSTA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA NO
ESTADO DA PARAÍBA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária.

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Franklin Riet Correa
Orientador Científico: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

PATOS-PB

2013

FICHA CATALOGRÁFICA
Dados de Acordo com AACR2, CDU E CUTTER
Biblioteca Setorial - CSTR/UFCG – Campos de Patos-PB

C837e

2013

Costa, Valéria Medeiros de Mendonça

Estudo epidemiológico da tristeza parasitária bovina no estado da Paraíba/Valéria Medeiros de Mendonça Costa - Patos: CSTR/PPGMV, 2013

107 f.

Inclui bibliografia.

Orientador (a): Franklin Riet-Correa

Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Epidemiologia. 2 – Tristeza parasitária bovina. 3 - *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 4 – Título.

CDU: 576.8:619

VALÉRIA MEDEIROS DE MENDONÇA COSTA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA NO
ESTADO DA PARAÍBA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária.

Aprovada em ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Franklin Riet Correa – Orientador Acadêmico

**Universidade Federal de Campina Grande – Campus de Patos-PB
Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária**

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna – Orientador Científico

**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal**

Prof. Dr. Maurício Cláudio Horta

**Universidade Federal do Vale do São Francisco – Petrolina-PE
Colegiado de Medicina Veterinária**

Dr. Expedito Kennedy Alves Camboin

**Extensionista Rural II - Médico Veterinário
Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural – Emater/PB**

Prof. Dr. Wilson Wouflan da Silva

**Universidade Federal de Campina Grande – Campus de Patos - PB
Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas**

RESUMO

Esta tese inclui três artigos sobre a epidemiologia da tristeza parasitária bovina (TPB) no cariri e sertão paraibano. O primeiro capítulo é um artigo que descreve a ocorrência de surtos de TPB no sertão paraibano, sendo 18 de anaplasmose por *Anaplasma marginale*, dois de babesiose por *Babesia bigemina*, dois por *Babesia* não identificada e dois por infecção mista por *Anaplasma marginale* e *Babesia* sp. Os surtos se concentraram no final do período chuvoso e início do período seco de cada ano, sendo 22 em animais adultos e dois em bezerros de aproximadamente 11 meses. Dois surtos ocorreram em bovinos da raça Nelore, um em animais da raça Gir e os 21 restantes ocorreram em animais das raças Holandesa, Pardo Suíça e mestiças das mesmas com zebuínos. No segundo capítulo foi investigado a soroprevalência de *A. marginale*, *B. bigemina*, *B. bovis* e *T. vivax*, assim como os fatores de risco para estas infecções. A presença de anticorpos nos soros dos animais foi detectada pela técnica de imunofluorescência indireta, utilizando antígenos específicos. Os valores médios de soroprevalência por fazenda foram 15% (0-75%) para *A. marginale*, 9,5% (0-40%) para *B. bigemina*, e 26,9% (0-73,7%) para *B. bovis*. No terceiro capítulo foi realizado um estudo para determinar a incidência de infecções naturais por *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* em bezerros a partir dos 30 dias de nascidos em fazendas do semiárido paraibano. Os valores de incidência pela reação de polimerase em cadeia (PCR) para infecção por *A. marginale* variou de 0%, 83,3%, 85,7, 100% e 100%. Os valores de incidência para *B. bigemina* foram de 12,5% e 85,7% em duas propriedades. A infecção por *B. bovis* foi observada somente em uma propriedade com percentual de incidência de 42,8%. Na detecção de anticorpos pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), os valores de incidência para infecção por *A. marginale* para as 5 fazendas foram, respectivamente, de 0%, 50%, 42,8%, 14,3% e 28,6%. Soropositividade para *B. bigemina* e *B. bovis* foi observada apenas em uma propriedade, com incidência de 57,1% e 71,4%, respectivamente. Conclui-se que o Cariri e o Sertão Paraibanos são áreas de instabilidade enzoótica para os três agentes da TPB.

Palavras-chaves: Epidemiologia, tristeza parasitária bovina, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, bezerros, prevalência, incidência.

ABSTRACT

This thesis contains three articles on the epidemiology of tick fever in the semiarid region of Paraíba. The first chapter is an article that describes the occurrence of outbreaks of tick fever in the semiarid region of Paraíba, 18 of anaplasmosis by *Anaplasma marginale*, two of babesiosis by *Babesia bigemina*, two by unidentified *Babesia* and two by mixed infection with *Anaplasma marginale* and *Babesia* sp. The outbreaks were concentrated at the end of the rainy season and early dry season each year. Twenty two occurred in adult cattle and two in calves of approximately 11 months-old. Two outbreaks occurred in Nelore cattle, one in Gir, and the remaining 21 occurred in animals of the Holstein or Brown Swiss breeds or crosses of these breeds with Zebu cattle. In the second chapter we investigated the seroprevalence of *A. marginale*, *B. bigemina*, *B. bovis* and *T. vivax* in cattle, as well as the risk factors for these infections. The presence of antibodies in the serum of animals was detected by indirect immunofluorescence (IFA), using specific antigens. Mean values for farm seroprevalence was 15.0% (0-75%) for *A. marginale*, 9.5% (0-40%) for *B. bigemina*, and 26.9% (0 to 73.7%) for *B. bovis*. In the third chapter the incidence of natural infection by *A. marginale*, *B. bovis* and *B. bigemina* in calves was monitored each 14 days from one to 12 months-old in 5 farms in the semiarid region of Paraíba. By polymerase chain reaction (PCR), the incidence of *A. marginale* infections were 0%, 83.3%, 85.7%, 100%, and 100%. The incidence of *B. bigemina* infections were 12.5% and 85.7% in two farms. Infection with *B. bovis* was observed only in one farm with incidence of 42.8%. By the detection of antibodies by the IFA the incidence of infections by *A. marginale* in 5 farms were, respectively, 0%, 50%, 42.8%, 14.3% and 28.6%. Seropositivity to *B. bigemina* and *B. bovis* was found in only two farms, with incidences of 57.1% and 71.4%, respectively. It is concluded that the semiarid region of Paraíba is of enzootic instability for tick fever.

Keywords: Epidemiology, tick fever, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, calves, prevalence, incidence.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1. Distribuição mensal dos surtos de tristeza parasitária bovina nos anos de 2007 a 2009. 22
- Figura 2. Acima observa-se as médias de chuvas mensais no município de Patos durante o período de 1996-2006, no sertão paraibano, e abaixo as quantidades mensais de chuvas nos anos de 2007, 2008 e 2009 no mesmo município. Fonte: Agência Executiva de Gestão de Águas do Estado da Paraíba..... 23

CAPÍTULO II

- Figura 1. Número de fazendas por município de acordo com as regiões geográficas do Estado da Paraíba, nordeste do Brasil. 36

CAPÍTULO III

- Figura 1. Número total de tabanídeos adultos capturados por armadilhas Canopy e NZI, armadas por um período de 8 dias consecutivos em cada mês, nas Fazendas A e B (São José de Espinharas/Piancó) e D (Cabaceiras), Paraíba, de março de 2010 a janeiro de 2012. 58
- Figura 2. Valores médios de temperatura (temp.) máxima, média e mínima, umidade relativa e valor total mensal (precipitação) registrados para os municípios de Patos e Cabaceiras, Paraíba, de janeiro de 2010 a janeiro de 2012 59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Dados epidemiológicos e hemoparasitas identificados em 24 surtos de tristeza parasitária ocorridos no sertão da Paraíba no período de 2007 a 2009. 21

CAPÍTULO II

Tabela 1. Categoria dicotômica de cada variável independente usada na análise estatística de soropositividade de vacas para *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* no Estado da Paraíba, Brasil..... 37

Tabela 2. Resultados do teste de imunofluorescência (IFA) realizada com antígenos para *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Trypanosoma vivax* no soro sanguíneo de vacas de três regiões geográficas do estado da Paraíba, nordeste do Brasil. 38

Tabela 3. Resultados das análises multivariadas entre vacas sorologicamente positivos para *Anaplasma marginal*, *Babesia bigemina* ou *Babesia bovis* e variáveis independentes. Cada variável dependente foi analisada com variáveis independentes que foram previamente selecionadas nas análises univariadas, considerando $P < 0,20$ 39

CAPÍTULO III

Tabela 1. Incidência da infecção por *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* em bezerros durante o primeiro ano de vida em cinco fazendas da Paraíba, dentro do período de julho de 2010 a janeiro de 2012..... 57

Tabela 2. Avaliação comparativa dos valores de hematócrito das amostras de sangue de bezerros, positivas (+) e negativas (-) na PCR para *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, em propriedades rurais do semi-árido paraibano, de 2010 a 2012. 60

Tabela 3. Resultados de sequenciamento de DNA de produtos de PCR com primers direcionados a um fragmento de 340-pb do gene rap-1 de *Babesia bigemina*, em amostras de sangue de bezerros de fazendas da Paraíba. 61

Tabela 4. Resultados de sequenciamento de DNA de produtos de PCR com primers direcionados a um fragmento de 347-pb do gene rap-1 de <i>Babesia bovis</i> , em amostras de sangue de bezerros de fazendas da Paraíba.	62
Tabela 5. Resultados de sequenciamento de DNA de produtos de PCR com primers direcionados a um fragmento de 300-pb do gene msp1a de <i>Anaplasma marginale</i> , em amostras de sangue de bezerros de fazendas da Paraíba.	63
Tabela 6. Comparação da sorologia para <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia. bigemina</i> e <i>Babesia bovis</i> com a PCR (padrão-ouro) para cada agente.....	64
Tabela 7. Comparação dos resultados de PCR para <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bigemina</i> e <i>Babesia bovis</i> com a reação sorológica de imunofluorescência indireta (padrão-ouro) para cada agente	65
Tabela 8. Comparação dos resultados de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bigemina</i> e <i>Babesia bovis</i> em vacas testadas entre 2009 e 2010 (Costa et al. 2011) e nas vacas mães dos bezerros avaliados no presente estudo.....	66

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	11
REFERÊNCIAS.....	14
CAPÍTULO I - TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA NO SERTÃO DA PARAÍBA 15	
ABSTRACT.....	16
RESUMO.....	16
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	19
DISCUSSÃO.....	23
REFERÊNCIAS.....	26
CAPÍTULO II - SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA ANAPLASMOSE, BABESIOSE E TRIPANOSSOMIASES EM BOVINOS NA REGIÃO SEMIÁRIDA DA PARAÍBA.....	28
ABSTRACT.....	29
RESUMO.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO.....	40
AGRADECIMENTOS.....	43
REFERÊNCIAS.....	43
CAPÍTULO III - INCIDÊNCIA DA INFECÇÃO POR <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bigemina</i> E <i>Babesia bovis</i> EM BOVINOS DURANTE O PRIMEIRO ANO DE VIDA EM FAZENDAS DO SEMIÁRIDO PARAIBANO.....	47
ABSTRACT.....	48
RESUMO.....	49
INTRODUÇÃO.....	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	51
RESULTADOS.....	54
DISCUSSÃO.....	67
AGRADECIMENTOS.....	70
REFERÊNCIAS.....	70
CONCLUSÕES.....	73

ANEXOS.....	75
-------------	----

INTRODUÇÃO

Esta tese é formada por três trabalhos, todos relacionados à epidemiologia da tristeza parasitária bovina (TPB) no semiárido da Paraíba. O primeiro artigo descreve a ocorrência de surtos de TPB no sertão paraibano. No segundo, foi investigado a soroprevalência para *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Trypanosoma vivax* em vacas, assim como os fatores de risco para estas infecções. No terceiro foi realizado um estudo para determinar a incidência de infecções naturais por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* em bezerros a partir dos 30 dias de nascidos em fazendas do semiárido paraibano.

A situação atual das doenças parasitárias mais importantes do semiárido Paraibano, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e TPB, mosca dos chifres (*Haematobia irritans*) e parasitoses gastrintestinais de caprinos e ovinos podem ser definidas como um caos parasitológico (NARI, 2011). Os surtos de TPB são frequentes, principalmente no final das chuvas e, pelos trabalhos desta tese, se sabe que no semiárido da Paraíba há áreas livres de carrapato, áreas de estabilidade e áreas de instabilidade enzoótica para TPB, mas não se conhecem as variações entre as diferentes regiões nem as variações de um ano para outro, dependendo da extensão do período de seca. Não se conhece a epidemiologia da doença com detalhes nem a ocorrência de resistência. Não temos definido formas adequadas de controle. Os erros no controle do carrapato, dependendo somente da utilização de carrapaticidas, com tratamentos frequentes e subdoses (COSTA et al., 2011), têm levado certamente ao aparecimento de resistência parasitária, que até o momento não foi diagnosticada e, mais do que isso, à contaminação ambiental, até agora desconhecida. Adicionalmente, não há um sistema de diagnóstico sistemático adequado, nem da doença, nem da resistência. Não adianta fazer um ou vários trabalhos de pesquisa relatando aspectos epidemiológicos da doença, nem resistência em algumas fazendas; temos que contar com um diagnóstico de rotina, incluindo as técnicas tradicionais (hematócrito e esfregaço) além de diagnóstico sorológico e possivelmente, diagnóstico molecular. Nesta tese esses diagnósticos foram realizados com a colaboração de instituições de São Paulo e Minas Gerais. Uma situação ainda pior constata-se com a mosca de chifre; não se conhece a sua epidemiologia, nem sequer a frequência nas diferentes épocas do ano. O produtor não tem nenhuma assistência técnica no referente ao tratamento; trata sem conhecer a

eficiência do produto, às vezes com produtos inadequados, e repete os tratamentos cada vez que aumenta o número de moscas nos seus animais. Não se tem nenhuma informação sobre resistência, que certamente existe. Obviamente que os tratamentos para a mosca do chifre também tratam o carrapato, e vice-versa, criando mais resistência e aumentando a contaminação ambiental e o risco dos consumidores em consumir produtos de origem animal contaminados por pesticidas.

A situação das parasitoses gastrintestinais não é diferente. Há diversos trabalhos que constataram a resistência aos anti-helmínticos. Em um trabalho recente foi encontrada multiresistência a todas as drogas em sete fazendas (RIET-CORREA, 2013). Ainda no momento há diversos materiais de divulgação que aconselham três tratamentos anti-helmínticos durante a seca e um durante as chuvas, prática que é, provavelmente, a maior responsável pela resistência anti-helmíntica no semiárido. Com esta situação não há nenhum veterinário que recomende testar ou teste a eficiência do anti-helmíntico que está sendo utilizado quando se geram dúvidas da sua eficiência ou que recomende ou faça testes de resistência antes de trocar de anti-helmíntico. Não há recomendações de outras medidas que podem diminuir a utilização de anti-helmínticos e levar a um controle mais eficaz e que evitem a resistência, como o caso dos tratamentos seletivos. O FAMACHA tem sido utilizado experimentalmente (VILELA et al., 2012; RIET-CORREA 2013), mas não é utilizado pelos produtores. Certamente esta situação tem uma tendência a piorar rapidamente, de tal forma que se não são mudadas as práticas de controle poderemos passar da situação de caos para uma situação de colocar em risco a caprino-ovinocultura, na qual a mesma resultará inviável pelas dificuldades em controlar as parasitoses gastrintestinais.

Perante essa situação de caos cabe a pergunta: quem é responsável pela mudança? Certamente, todos somos responsáveis. As instituições de pesquisa, na Paraíba exclusivamente as Universidades, somos responsáveis por que não geramos o conhecimento adequado. As Universidades são responsáveis, também, como instituições de ensino, pois formam veterinários que não têm o conhecimento nem a compreensão do problema; quantos veterinários se formam conhecendo a epidemiologia das principais parasitoses e o grave problema da resistência parasitária e como controlá-la? A resposta é fácil: muito poucos ou, mais provavelmente, nenhum. As instituições de extensão rural também são responsáveis, pois divulgam técnicas inadequadas, baseadas muito mais na propaganda dos vendedores de produtos veterinários do que em conhecimentos gerados sobre a realidade regional. Os serviços veterinários por outro

lado estão dedicados ao controle de 3 ou 4 doenças infecciosas, sem sequer tomar conhecimento das outras doenças, por mais importantes que sejam. As associações e cooperativas de produtores e os próprios produtores são, certamente, os que têm menor responsabilidade. O que poderiam fazer no meio do caos, sem saber a quem escutar nem o que escutar?

Mudar as nossas práticas é extremamente necessário. Temos que produzir trabalhos de pesquisa para resolver os problemas dos produtores e da produção, com uma visão multidisciplinar. Não podemos estudar as doenças como se estas fossem isoladas da realidade ou estudá-las desde um só ponto de vista. Os pesquisadores têm que conhecer os problemas da produção, saber conversar e trabalhar com os produtores. É muito frequente que os pesquisadores ou seus alunos visitem as fazendas para coletar amostras para, no futuro, não voltar nunca mais à mesma. Muitos produtores reclamam disso. As avaliações de projetos e trabalhos de pesquisa têm que avaliar a pertinência dos mesmos. Não é possível continuar financiando projetos de pesquisa aplicada cujos resultados nunca vão ser aplicados, pois são totalmente divorciados da realidade. Não é mais possível seguir financiando projetos que o único problema que vão solucionar é o do próprio pesquisador ou do seu orientado: manter uma bolsa ou receber um diploma de mestrado ou doutorado sem ter a mínima ideia da importância da pesquisa científica para a sociedade.

Temos que criar sistemas de diagnóstico tanto nas Universidades como nas demais instituições. Os veterinários privados deveriam realizar testes de diagnóstico como o fazem hoje para brucelose ou mormo. É impossível hoje pensar em realizar tratamentos anti-helmínticos ou para carrapato sem fazer testes de resistência. Os testes de resistência anti-helmíntica deveriam ser aplicados rotineiramente pelos veterinários de campo ou por laboratórios de diagnóstico privados. Deveríamos ter os testes sorológicos para *Babesia* spp. e *A. marginale* na rotina de diversos laboratórios públicos e privados. É claro que em áreas de instabilidade enzoótica será imprescindível a utilização de vacinas contra *Babesia* spp. e *A. marginale*, como ocorre em outros países; quem vai criar essa tecnologia para o semiárido? Quem vai produzir essas vacinas para o pequeno produtor do sertão nordestino?

As instituições de extensão e os produtores devem, permanentemente, exigir, tanto do Governo quanto das instituições públicas de pesquisa a prestação de contas dos recursos utilizados em pesquisa. No Brasil, a grande maioria da pesquisa é financiada com dinheiro público, portanto nós pesquisadores devemos prestar contas à sociedade

sobre o que estamos fazendo com esses recursos e para quem estamos fazendo as pesquisas.

Os serviços veterinários públicos, municipais, estaduais ou federais, devem sair da letargia na que se encontram. Têm que participar, mediante assistência técnica, diagnóstico ou outras atividades, do esforço por controlar as principais doenças que afetam nossos animais de produção.

Esta tese tem resultados importantes para o conhecimento da TPB e de *R. microplus*. No momento, há na UFCG pelo menos dois projetos sobre o mesmo tema: um sobre resistência de *R. microplus* aos acaricidas e outro sobre o ciclo de vida livre de *R. microplus* em condições naturais. Mas isso não é suficiente, pois não garante a continuidade da geração de conhecimento pertinente, que está apenas no início. O que devemos discutir durante a defesa desta tese? Será mais importante discutir aspectos relacionados a esses trabalhos, incluindo os pontos e as vírgulas? Ou será mais importante discutir os pontos mencionados nesta introdução? Nós não temos nenhuma dúvida: a última alternativa é imensamente mais importante, e se os pesquisadores, pós-graduandos e extensionistas que estarão assistindo a esta apresentação ou formando parte da banca, encontram algum caminho a seguir, já será um ganho enorme.

Referências

- Costa V.M.M., Rodrigues A.L., Medeiros J.M.A., Labruna M.B., Simões S.V.D. & Riet-Correa F. 2011. Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 31(3):239-243.
- Nari Henrioud A., 2011. Towards sustainable control practices in livestock production with emphasis in Latin America. *Vet. Parasitol.* 180:2-11.
- Riet-Correa B. 2013. Assistência técnica integral à caprinocultura leiteira no semiárido com ênfase no controle parasitário. Tese de Doutorado, Universidade Federal da Paraíba. 68p.
- Vilela V.L.R., Feitosa T.F., Linhares E.F., Athayde A.C.R., Molento M.B. & Azevedo S.S. 2012. FAMACHA© method as an auxiliary strategy in the control of gastrointestinal helminthiasis of dairy goats under semiarid conditions of Northeastern Brazil. *Vet. Parasitol.* 190:281–284.

CAPÍTULO I

TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA NO SERTÃO DA PARAÍBA

O presente trabalho foi formatado nas normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira (anexo 2). O artigo foi submetido em 08 de setembro de 2010.

Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba¹

Valéria M. de M. Costa^{2*}, Alberto L. Rodrigues², João M. de A. Medeiros²,
Marcelo B. Labruna³, Sara V.D. Simões² e Franklin Riet- Correa²

ABSTRACT. - Costa V.M.M., Rodrigues A.L., Medeiros J.M.A., Labruna M.B., Simões S.V.D. & Riet-Correa F. 2011. [Cattle tick fever in the semiarid region of the Brazilian state of Paraíba.] Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(3):00-00. Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, 58700-970 Patos, PB, Brasil. E-mail: valery.medeiros@hotmail.com

Twenty four outbreaks of cattle tick fever are reported in the semiarid region of Paraíba known as Sertão. Eighteen outbreaks were caused by *Anaplasma marginale*, two by *Babesia bigemina*, and two by mixed infection of *A. marginale* and *Babesia* sp. In other two outbreaks of babesiosis the species of *Babesia* was not identified. Outbreaks occurred from August 2007 to October 2009, however with a concentration of the outbreaks at the end of the rainy period and beginning of the dry period in each year. Twenty two outbreak affected adult cattle and two affected calves approximately 11 months-old. Three outbreak affected *Bos taurus indicus* cattle, of the Nelore and Gir breeds. In 21 outbreaks Holstein, Brown Swiss and crossbred of these breeds with *Bos taurus indicus* cattle were affected. It is concluded that in the Sertão of Paraíba there are areas of enzootic instability for cattle tick fever occurring outbreaks at the end of the rainy season, mainly in hilly areas of the Borborema region, and in wet areas of some river basins, including Rio do Peixe, Rio Piranhas and Rio Espinharas.

INDEX TERMS: Anaplasmosis, babesiosis, ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, semiarid.

RESUMO.- Descrevem-se 24 surtos de tristeza parasitária bovina no sertão paraibano, sendo 18 de anaplasmosose por *Anaplasma marginale*, dois de babesiose por *Babesia bigemina*, dois por *Babesia* não identificada e dois por infecção mista de *A. marginale* e

Babesia sp. Os surtos ocorreram entre agosto de 2007 a outubro de 2009, porém, com uma concentração dos surtos no final do período chuvoso e início do período seco de cada ano, sendo 22 em animais adultos e dois em bezerros de aproximadamente 11 meses. Dois surtos ocorreram em bovinos da raça Nelore, um em animais da raça Gir e os 21 restantes ocorreram em animais das raças Holandês, Pardo Suíço e mestiços das mesmas com zebuínos. Conclui-se que no Sertão da Paraíba há áreas de instabilidade enzoótica, ocorrendo surtos de tristeza no final da época de chuvas, principalmente nas áreas de planaltos e serras da região da Borborema e em áreas úmidas como a Bacia do Rio do Peixe, Rio Piranhas e Rio Espinharas em que há a formação de microclimas favoráveis à sobrevivência do carrapato.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Anaplasmose, babesiose, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, semiárido.

INTRODUÇÃO

Anaplasmose e babesiose são duas enfermidades distintas, que formam o complexo conhecido como tristeza parasitária bovina (TPB). A babesiose é causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e a anaplasmose causada pela rickettsia *Anaplasma marginale*. Os três agentes são transmitidos pelo carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A anaplasmose também pode ser transmitida de forma iatrogênica, transplacentária e por vetores mecânicos como moscas hematófagas, mutucas e culicídeos (Kessler 2001).

A distribuição geográfica da TPB é limitada pela presença do carrapato vetor, que necessita de fatores ambientais favoráveis para completar seu ciclo biológico, variando em três áreas de ocorrência: 1) áreas livres, onde o carrapato não ocorre devido a condições climáticas que impedem o desenvolvimento do parasito; 2) áreas de instabilidade enzoótica, onde a ocorrência de uma estação seca ou fria impede o desenvolvimento da fase de vida livre do carrapato durante parte do ano. Assim, os bovinos passam uma época do ano sem ter contato com o parasita ou com poucos carrapatos, com isso não desenvolvem imunidade duradoura contra a doença. Nesses rebanhos há um significativo risco de TPB devido à presença de suficiente número de animais susceptíveis que não foram infectados até os 7-10 meses de idade; 3) áreas de

estabilidade enzoótica, nesta o carrapato está presente durante todo o ano, de forma que os bovinos são expostos a carrapatos infectados até os 7-10 meses de idade e durante o resto da vida, permanecendo imunizados. Nesses rebanhos, são raros os casos de doença clínica (Madruga *et al* 1993, Sacco 2002).

A TPB é um dos problemas sanitários que causa maior prejuízo econômico na pecuária bovina, que se traduz por altos índices de mortalidade e morbidade, com significativa redução na produção de carne e/ou leite, aborto e menor fertilidade nos animais afetados e altos custos com tratamentos e manejos especiais (Sacco 2001). A infecção é causada pelo desenvolvimento e multiplicação de *Babesia spp.* e *A. marginale* nas células sanguíneas e tem como sinais clínicos febre, anemia, icterícia (mais intensa e comum na anaplasmosse), hemoglobinúria (na babesiose), parada ou redução da ruminação, sinais nervosos (característicos da babesiose por *B. bovis*, o mais virulento dos três agentes), anorexia e prostração (Dreher *et al.* 2005, Kocan *et al.* 2004, Souza *et al.* 2000).

O diagnóstico da TPB deve levar em consideração os dados epidemiológicos, sinais clínicos, lesões observadas à necropsia e principalmente exames laboratoriais. O diagnóstico clínico nos casos de suspeita de TPB torna-se de suposição uma vez que os sinais clínicos podem ser confundidos com os de outras doenças. Desta forma o diagnóstico laboratorial, pela identificação do agente e o hematócrito, torna-se de extrema importância para a confirmação da doença e, conseqüentemente, para se fazer o tratamento específico dos animais e com isso, reduzir também os custos com medicação (Farias 2007).

Na Paraíba a prevalência de anticorpos para *Babesia spp.* foi estudada nas regiões de Campina Grande, Boqueirão e Cariri, determinando-se que a primeira é de estabilidade enzoótica enquanto que as outras duas são de instabilidade enzoótica (Madruga *et al.* 1994). Na região de Sertão Paraibano a situação da tristeza parasitária não é bem conhecida, mas surtos ocorrem nas regiões mais altas e nos leitos dos rios mais importantes da região (Costa *et al.* 2009). Nas áreas mais secas do sertão *R. microplus* não sobrevive durante o período de seca, mas tristeza parasitária pode ocorrer quando bovinos com carrapatos são introduzidos no início do período chuvoso e o parasita se multiplica durante esse período (Costa *et al.* 2009). O presente trabalho objetiva relatar surtos de TPB no Sertão Paraibano e descrever alguns aspectos epidemiológicos da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na mesorregião do Sertão Paraibano, em propriedades onde ocorreram surtos ou casos isolados de TPB. Foram revisados protocolos de atendimento a campo e realizada leitura de lâminas de esfregaços sanguíneos de cada caso registrado no período de agosto de 2007 a setembro de 2009. O diagnóstico laboratorial foi realizado no Laboratório da Pós-Graduação no Hospital Veterinário da UFCG. Nas lâminas positivas para hematozoários foi calculado o percentual de parasitemia para cada agente encontrado. Amostras de sangue com anticoagulante foram processadas para determinação do volume globular pela técnica do microhematócrito. Após o diagnóstico as propriedades foram visitadas para aplicação de um questionário epidemiológico (ANEXO 3). Valores mensais de pluviosidade para o período de 1996 a 2009, mensurados no município de Patos, foram obtidos junto à Agência Executiva de Gestão de Águas do estado da Paraíba, a fim de se avaliar se a pluviosidade dos anos de 2007 a 2009 foram atípicas para a região, isto é, acima ou abaixo das médias dos anos pregressos.

RESULTADOS

Foram diagnosticados 24 surtos de tristeza parasitária bovina, sendo 18 de anaplasmose, dois de babesiose por *B. bigemina*, dois por *Babesia* não identificada e dois por infecção mista de *Anaplasma marginale* e *Babesia* sp. O percentual de eritrócitos parasitados por *A. marginale* nos esfregaços sanguíneos variou de 1,8% a 80% e nos parasitados por *B. bigemina* variou de 2,06% a 5,21%. Os valores do hematócrito, realizado em 16 animais, variaram de 8% a 18%. Em 22 surtos foram afetados bovinos maiores de 18 meses e, em dois, bovinos de aproximadamente 11 meses de idade (Quadro 1). A porcentagem de morbidade variou de 0,5 a 40,4 (média: 11,6), com a porcentagem de letalidade variando de 0 a 100 (média: 35,8). Dois surtos ocorreram em bovinos da raça Nelore, um em animais da raça Gir e os 21 restantes ocorreram em animais das raças Holandês, Pardo Suíço e mestiço das mesmas com zebuínos.

Dos 24 surtos, 22 ocorreram no final do período chuvoso e início do período seco, entre maio e outubro de cada ano (Fig.1). Os municípios afetados foram Piancó (19 surtos) que apresenta uma altitude de 264m e coordenadas geográficas de

07°11'52"S e 37°55'44"O, Aparecida (2 surtos) com uma altitude de 224m e coordenadas geográficas de 06°47'02"S e 38°05'13"O, Pombal (1 surto) que está situada a uma altitude de 184 metros e possui coordenadas de 06°46'12"S e 37°48'07"O, São José de Espinharas(1 surto) que se encontra a uma altitude de 208m e coordenadas de 06°50'49"S e 37°19'33"O e Patos (1 surto) que possui uma altitude de 242 metros e coordenadas geográficas de 07°01'28"S e 37°16'48"O. Nos anos de 2008 e 2009, quando foram observados 23 dos 24 surtos (Quadro1), observou-se um claro aumento no índice de chuvas na região estudada em relação ao ano de 2007 e à média do período 1996-2006 (Fig.2). Entre 1996 e 2006, a média de pluviosidade nos meses com maior abundância de chuvas (janeiro a maio) em Patos foi de 59,34 a 118,9mm mensais, valores próximos dos observados em 2007. No entanto, nos meses de 2008 e 2009, as quantidades de chuvas mensais praticamente dobraram ou triplicaram atingido valores máximos de 491,6mm para março/2008 e 641 mm para abril/2009.

Nas propriedades de Piancó foram observados carrapatos nos animais durante o período chuvoso, todos os anos. Com a aplicação do questionário verificou-se a aplicação indiscriminada, sem critérios técnicos, dos banhos carrapaticidas nos bovinos. Todos os banhos eram por aspersão, com frequência variável de duas vezes na semana, a cada oito dias, quinze dias ou a cada dois a três meses, porém sem um programa

Tabela 1. Dados epidemiológicos e hemoparasitas identificados em 24 surtos de tristeza parasitária ocorridos no sertão da Paraíba no período de 2007 a 2009.

Surto	Dados da Propriedade			Dados dos surtos				Hemoparasitas identificados no sangue		
	Município	Nº total de bovinos	Raça predominante	Mês/Ano	Nº de bovinos acometidos (% morbidade)	Nº de mortes (% letalidade)	Categoria acometida	<i>A. marginale</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>Babesi</i> asp. ^b
1	Piancó	20	Mestiça ^a	08/2008	Não disponível	Não disponível	Adulta		+	
2	Piancó	25	Mestiça ^a	06/2008	5 (20,0)	0 (0,0)	Adulta	+		
3	Piancó	20	Gir	09/2008	1 (5,0)	0 (0,0)	Adulta			+
4	Piancó	8	Mestiça ^a	04/2008	2 (25,0)	1 (50,0)	Adulta	+		
5	Piancó	80	Holandesa	08/2008	1 (1,25)	0 (0,0)	Adulta		+	
6	Piancó	26	Nelore	06/2008	1 (3,8)	1 (100)	Jovem	+		
7	Piancó	20	Mestiça ^a	06/2009	2 (10,0)	0 (0,0)	Adulta	+		
8	Piancó	15	Mestiça ^a	09/2008	2 (13,3)	0 (0,0)	Jovem	+		
9	Piancó	30	Mestiça ^a	08/2007	1 (3,3)	0 (0,0)	Adulta	+		
10	Piancó	25	Mestiça ^a	09/2008	1 (4,0)	0 (0,0)	Adulta	+		+
11	Piancó	10	Mestiça ^a	09/2008	1 (10,0)	1 (100)	Adulta			+
12	Piancó	15	Mestiça ^a	10/2008	2 (13,3)	0 (0,0)	Adulta	+		
13	Piancó	23	Mestiça ^a	12/2008	3 (13,0)	1 (33,3)	Adulta	+		
14	Piancó	40	Mestiça ^a	06/2008	1 (2,5)	0 (0,0)	Adulta	+		
15	Piancó	12	Mestiça ^a	08/2009	1 (8,3)	1 (100)	Adulta	+		+
16	Piancó	29	Mestiça ^a	08/2009	1 (3,4)	1 (100)	Adulta	+		
17	Piancó	15	Mestiça ^a	09/2009	2 (13,3)	0 (0,0)	Adulta	+		
18	Piancó	10	Mestiça ^a	09/2009	1 (10,0)	0 (0,0)	Adulta	+		
19	Piancó	17	Mestiça ^a	09/2009	1 (5,9)	0 (0,0)	Adulta	+		
20	Aparecida	87	Nelore	08/2008	10 (11,5)	9 (90,0)	Adulta	+		
21	Aparecida	200	Mestiça ^a	07/2009	1 (0,5)	0 (0,0)	Adulta	+		
22	S. J. Espinhara	120	Mestiça ^a	07/2009	7 (5,8)	5 (71,4)	Adulta	+		
23	Pombal	20	Pardo Suíça	07/2008	8 (40,0)	7 (87,5)	Adulta	+		
24	Patos	27	Mestiça ^a	05/2009	12 (44,4)	11 (91,7)	Adulta	+		

^aAnimais mestiços de raças zebuínas com Holandês e Pardo Suíço.

^bPor questões logísticas, a espécie de *Babesia* não foi identificada nesses surtos

estabelecido de controle de carrapatos. O momento dos banhos era decidido sob critério subjetivo do criador, a despeito de um possível número “elevado” de carrapatos visíveis, porém sem quantificação estabelecida. Em apenas uma propriedade foi verificada a aplicação correta do volume de calda carrapaticida aplicada nos banhos (4-5L/animal); em algumas propriedades eram usadas bombas de 20L para 13 a 40 animais adultos e em outras uma bomba de 10L para 8 a 15 animais adultos.

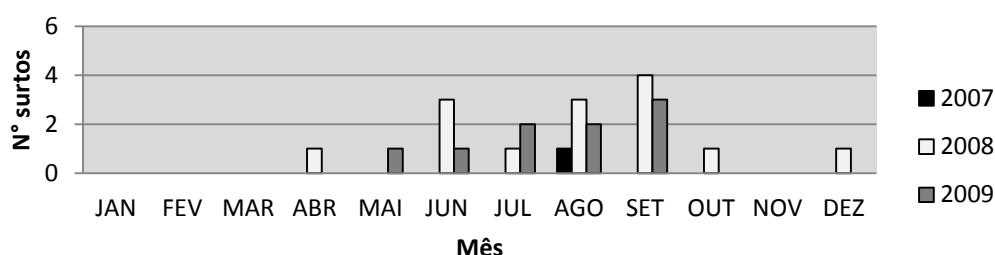


Figura 1. Distribuição mensal dos surtos de tristeza parasitária bovina nos anos de 2007 a 2009.

No surto em São José de Espinharas ocorrido em um rebanho de vacas mestiças Holandês, o proprietário não tinha observado infestação por carrapatos em anos anteriores. Neste rebanho, foi relatada a introdução recente de animais com carrapatos provenientes da Zona da Mata Pernambucana, área tida como de estabilidade enzoótica. O surto de anaplasmose ocorreu no mês de julho, morrendo cinco animais, de um total de 120.

Em Aparecida ocorreram dois surtos de anaplasmose. O primeiro afetou um rebanho de corte com 87 bovinos da raça Nelore. Dez animais adoeceram e nove morreram em dez dias. No segundo surto, não foram vistos carrapatos nos bovinos; no entanto, durante a aplicação do questionário foi informado que na propriedade era realizado o controle de carrapatos a cada oito dias, utilizando uma bomba de pulverização de 20 litros para banhar 25 animais. Ainda durante a visita foi informado que no período do surto havia a presença de numerosos tabanídeos na propriedade.

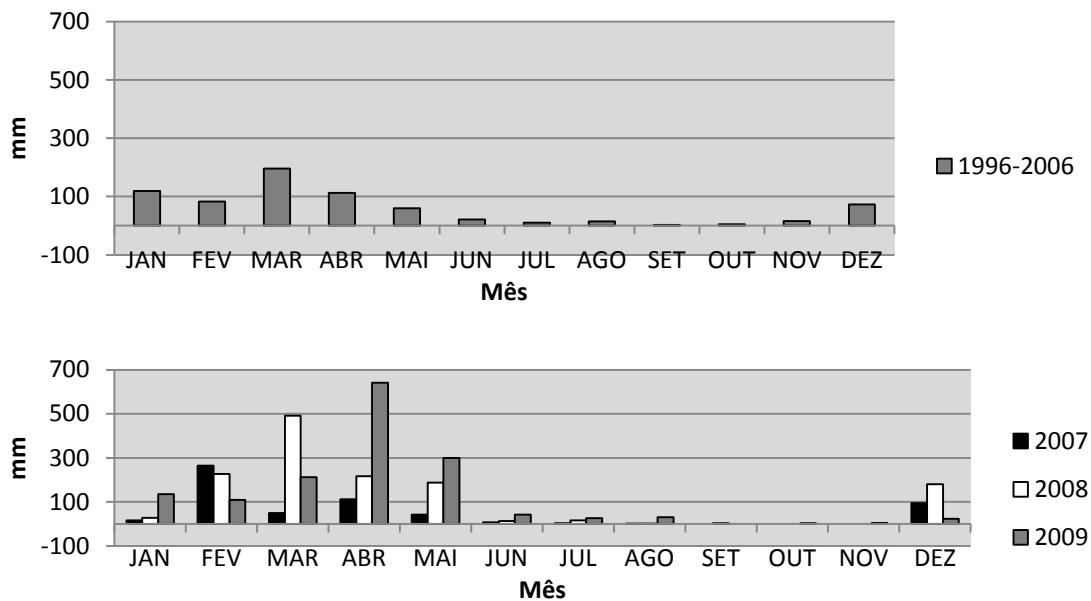


Figura 2. Acima se observa as médias de chuvas mensais no município de Patos durante o período de 1996-2006, no sertão paraibano, e abaixo as quantidades mensais de chuvas nos anos de 2007, 2008 e 2009 no mesmo município. **Fonte:** Agência Executiva de Gestão de Águas da Paraíba.

Na região de Patos, na bacia do Rio Espinharas, um surto de anaplasmosose ocorreu em uma propriedade localizada nas margens do Rio Espinharas, onde morreram 11 animais de um rebanho leiteiro de 27 vacas cruzas zebuínos com Holandês e Pardo Suíço. Foi mencionada a ocorrência de carrapatos nos animais em anos anteriores. Durante a primeira visita, realizada em junho de 2008, foi vista pouca quantidade de carrapatos. Os primeiros animais tinham adoecido em maio do mesmo ano e o rebanho era tratado com carrapaticidas a cada sete dias, numa proporção de dois litros de calda por animal. Neste surto foi realizada a necropsia de um dos animais acometidos, sendo observados macroscopicamente: icterícia, fígado cor de tijolo e baço aumentado. Em um surto de anaplasmosose em Pombal, adoeceram oito bovinos e morreram sete de um rebanho de 20 vacas da raça Pardo Suíço.

DISCUSSÃO

Este trabalho confirma os resultados de um estudo anterior que definiu que no Sertão da Paraíba ocorrem surtos de TPB no final da época de chuvas nas áreas de planaltos e serras, em áreas úmidas como as bacias do Rio do Peixe e Rio Piranhas e

também em áreas irrigadas, como no município de Patos, em que há a formação de microclimas favoráveis à sobrevivência do carrapato (Costa *et al.* 2009). No entanto, chama a atenção que enquanto no período de 2000 a 2007 foram diagnosticados 14 surtos da doença (Costa *et al.* 2009), somente nos anos de 2008 e 2009 foram observados 23 surtos. Esta maior frequência está, aparentemente, relacionada à ocorrência de dois anos seguidos com chuvas abundantes, em valores atipicamente acima da média histórica para a região. Estes resultados sugerem que no Sertão da Paraíba haja áreas de instabilidade enzoótica nas regiões mais altas do Sertão e nas bacias dos rios perenes, e áreas livres, nas regiões mais secas e quentes do Sertão. Mesmo nestas últimas, se bovinos com carrapatos são introduzidos no início do período de chuvas, podem ocorrer surtos no final do mesmo (Costa *et al.* 2009), como possivelmente ocorreu na propriedade em São José de Espinhara no presente trabalho. No entanto, essa situação pode não se tornar estável, já que mesmo em áreas livres os carrapatos podem sobreviver durante anos chuvosos ou se manter em áreas de maior umidade em beiras de açudes e pastagens irrigadas. Por outro lado as áreas livres provavelmente aumentem nos anos mais secos, quando as condições de sobrevivência do carrapato são mais difíceis, e diminuam nos anos mais chuvosos, em condições favoráveis para a sobrevivência do vetor.

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que, no Sertão paraibano, casos clínicos de TPB são mais frequentes por anaplasmoses do que por babesioses, fato que pode estar associado às formas de transmissão. *R. microplus* é o principal transmissor, mas a anaplasmoses pode ser ainda transmitida por vetores mecânicos como tabanídeos. No caso dos tabanídeos, uma parasitemia maior que 0,3% favorece a transmissão mecânica por estes insetos (Kieser *et al.* 1990). Neste trabalho, o percentual de hemácias parasitadas por *A. marginale* observado foi muito elevado (1,8% a 80%) quando comparado ao que é visto por outros autores, onde dificilmente atinge 0,3% (Kieser *et al.* 1990). As altas parasitemias certamente possibilitam a transmissão por vetores mecânicos, tais como mutucas, que são comuns em todas as propriedades do Sertão no período chuvoso. Uma vez que haja bovinos sintomáticos com altas parasitemias no rebanho, a ocorrência de novos casos poderia ser potencializada pelos tabanídeos, comuns em todas as propriedades do sertão no período chuvoso. Essa hipótese ainda precisa ser testada, pois não existem dados publicados sobre esse assunto na região estudada.

Outra forma importante de transmissão é o uso coletivo de agulhas durante as vacinações e a aplicação de algumas medicações realizadas nos rebanhos, comuns nas criações de bovinos na região. No semiárido, a possibilidade de transmissão de *A. marginale* por esse meio, deve ser pesquisada para que possam ser tomadas as medidas preventivas adequadas. De qualquer forma é recomendável que nas áreas onde foi diagnosticado anaplasmoses, não se utilize a mesma agulha para a administração coletiva de medicamentos e vacinas.

Semelhante ao que vem ocorrendo em outras áreas de instabilidade enzoótica (Farias 2007) a grande maioria de bovinos afetados são adultos. Bovinos de todas as idades são suscetíveis à infecção destes hemoparasitos, sendo que os animais jovens apresentam menor resistência à doença do que os animais adultos. A maior frequência da doença em adultos se deve às condições climáticas do Sertão Paraibano que não permite a presença constante do carrapato e com isso, não há transmissão contínua dos agentes da TPB aos bovinos, principalmente em animais jovens, fazendo com que estes não desenvolvam imunidade específica adequada e tornem-se adultos sensíveis. Também foi constatado neste trabalho que os animais mais afetados são bovinos das raças Holandesas, Pardo Suíço e suas cruzas com animais da raça Gir, utilizadas para a produção de leite. Somente três surtos ocorreram em *Bos taurus indicus*, em gado das raças Nelore e Gir. Bovinos *Bos taurus taurus* são mais sensíveis à infestação por carrapatos que bovinos *Bos taurus indicus*, e as cruzas se situam em um nível intermediário de susceptibilidade (Payne & Osório 1990).

A avaliação dos resultados deste trabalho e de um trabalho anterior (Costa et al. 2009) evidencia as dificuldades para se estabelecer medidas de controle e profilaxia da TPB no semiárido. Em áreas altas de serra (Piancó, por exemplo) e bacias de rios (Aparecida e Patos, por exemplo), onde o carrapato é mais frequente, seria necessário que os produtores optassem por uma convivência com o mesmo, diminuindo a frequência dos banhos e deixando que os bezerros se infectem ainda nos primeiros meses de idade. Nesta situação os adultos somente deveriam ser tratados com carrapaticidas quando evidenciem uma infestação importante, que possa causar prejuízos ao animal. Segundo Junqueira (2010) a partir de 20-30 carrapatos por animal ocorrem perdas produtivas em animais adultos, portanto poderia recomendar-se o tratamento carrapaticida quando houvesse infestação de 10-20 fêmeas adultas. Os bezerros não deveriam ser banhados a menos que apresentassem infestações graves. Pelo contrário, é uma prática comum na região que os produtores comecem a banhar

todos os animais imediatamente após detectar infestação por carrapatos adultos. Outras alternativas que deveriam ser consideradas, no futuro, são a utilização da premunição como forma de profilaxia para a babesiose e anaplasmoses, (Gonçalves 2000), ou mesmo vacinas contra *R. microplus*, que por manter um número limitado de carrapatos nos animais favorece o estabelecimento da estabilidade enzoótica para babesiose e anaplasmoses (Suarez *et al.* 2007). Em áreas onde o carrapato não consegue sobreviver de um ano para outro, a opção deveria ser por erradicar o mesmo da fazenda ou mantê-lo em quantidades muito baixas para que não ocorra transmissão. Neste caso é importante evitar a introdução de animais parasitados, tratando-os eficientemente enquanto permanecem em quarentena antes de serem introduzidos no rebanho. É evidente que as possibilidades de êxito em ambos os casos são limitadas, pois permanece o risco de ocorrência de TPB.

REFERÊNCIAS

- Costa V.M.M, Simões S.V.D. & Riet-Correa F. 2009. Doenças parasitárias em ruminantes no semiárido brasileiro. *Pesq. Vet. Bras.* 29 (7) : 563-568.
- Dreher U.M., Lehmann R.H., Meli M.L., Regula G., Cagienard A.Y., Srank K.D.C., Doherr M.G.; Filli F., Hassig M., Braun U., Kocan K.M. & Lutz H. 2005. Seroprevalence of anaplasmoses among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: No evidence of an emerging disease. *Veter. Microbiol.* 107(1/2):71-79.
- Eriks I.S., Stiller D. & Palmer G.H. 1993. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J. Clin. Microbiol.* 31(8):2091-2096.
- Farias N.A. 2007. Tristeza parasitária, p.524-532. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Eqüinos*. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS.
- Gonçalves P.M. 2000. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. *Cienc. Rur.* 30(1):187-194.
- Junqueira P. 2010. Garrapatos *Boophilus* em El ganado bovino: biología, prevención y control. Disponível em: <<http://www.Parasitosdelganado.net/index.php>> Acesso em 21 de setembro de 2010.
- Kessler R.H. 2001. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Bras.* 21(4):177-179.

- Kieser S.T, Eriks I.S. & Palmer G.H. 1990. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect. Immun.*58(4):1117-1119.
- Kocan K.M., De La Fuente J.,Blouin E.F. & Garcia-Garcia J.C. 2004. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): Recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology* 129(Suppl.):285-300.
- Madrugá C.R., Honer M.R., Andreotti M.R. & Araújo F.R. & Santarém V. 1993. Prevalência de *Anaplasma marginale* em três regiões do estado da Paraíba. *Anais VI Congresso Internacional de Medicina Veterinária em Língua Portuguesa*, p.350-352.
- Payne R.C. & Osorio O. 1990. Tick-borne diseases of cattle in Paraguay. I. Seroepidemiological studies on anaplasmosis and babesiosis. *Trop. Anim Health Prod.*1(22):53-60.
- Sacco A.M.S. 2001. Controle/profilaxia da tristeza parasitária bovina. *Comunicado Técnico 38, Embrapa Pecuária Sul, Bagé.* 3p.
- Sacco A.M.S. 2002. Controle de surtos de tristeza parasitária bovina. *Circular Técnica 26, Embrapa Pecuária Sul, Bagé.* 4p.
- Souza J.C.P., Soares C.O., Scofield A., Madrugá C.R., Cunha N.C., Massard C.L. & Fonseca A.H. 2000. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. *Pesq. Vet. Bras.* 20(3):97-101.
- Suárez Pedroso M., Mellor L.M., Valdez M., Souza R.M., Camargo A.J.R., Vargas N. C. & Evanoff E.A. 2007. Control de las infestaciones de La garrapata *Boophilus microplus* em La ganadería Cubana y em regiones de latino América com La aplicación Del inmunógeno Gavac® dentro de un programa de lucha integral. Disponível em: <http://www.corpoica.org.co/redectopar.asp> > Acesso em 21 de setembro de 2010.

CAPÍTULO II

SOROPREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA ANAPLASMOSE, BABESIOSE E TRIPANOSSOMIASES EM BOVINOS NA REGIÃO SEMIÁRIDA DA PARAÍBA.

Trabalho formatado nas normas da Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (anexo 4). Artigo aceito para publicação (anexo 6).

Soroprevalência e fatores de risco para anaplasmose, babesiose e tripanossomíase
bovina em uma região semiárida do Brasil

**Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and
trypanosomosis in a Brazilian semiarid region**

Valéria M. M. Costa¹; Múcio Flávio B. Ribeiro²; Amélia Lizziane L. Duarte¹; Julia M.
Mangueira¹; André Flávio A. Pessoa¹; Sergio S. Azevedo¹; Antonio Thadeu M. Barros³;
Franklin Riet-Correa¹; Marcelo B. Labruna^{4*}

¹ Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural da
Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, Brasil

² Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal
de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária do
Pantanal, Corumbá, MS, Brasil.

⁴ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil

* **Autor correspondente:** Marcelo Bahia Labruna. Departamento de Medicina
Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade de São Paulo, Brasil. e-mail: labruna@usp.br

Abstract

The seroprevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, and
Trypanosoma vivax and the risk factors for these infections were investigated in 509
cows from 37 farms in the semiarid region of Paraíba, northeastern Brazil. Cow sera
were tested by immunofluorescence assay (IFA) against each specific antigen. Mean
seroprevalence values per farm were 15.0% (range: 0-75%) for *A. marginale*, 9.5%
(range: 0-40%) for *B. bigemina*, and 26.9% (range: 0-73.7%) for *B. bovis*. All cows

tested negative for *T. vivax*. Higher prevalence for *A. marginale* was significantly associated with a less frequent acaricide spraying per year, and with higher use of injectable antihelmintics. The presence of positive cows for *B. bigemina* was significantly associated with the use of acaricide, and with the presence of horse flies in the farm. Both the occurrence and the higher prevalence of *B. bovis* were significantly associated with the recent observations of ticks on cattle. Overall, the present results indicate that the region investigated represents an enzootic instable area for *A. marginale*, *B. bigemina*, and *B. bovis* since most animals were seronegative to at least one agent.

Keywords: *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, cattle, risk factors, Brazil.

Resumo

A soroprevalência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Trypanosoma vivax*, assim como os fatores de risco para estas infecções, foram investigadas em 37 fazendas (total de 509 vacas) da região semiárida da Paraíba, nordeste do Brasil. A presença de anticorpos nos soros dos animais foi detectada pela técnica de imunofluorescência indireta, utilizando antígenos específicos. Os valores médios de soroprevalência por fazenda foram 15% (0-75%) para *A. marginale*, 9,5% (0-40%) para *B. bigemina*, e 26,9% (0-73,7%) para *B. bovis*. Todas as vacas foram soronegativas para *T. vivax*. As maiores prevalências de *A. marginale* foram significativamente associadas com menor uso de carrapaticidas por ano e com uso mais frequente de antihelmínticos injetáveis. A soroprevalência de *B. bigemina* foi significativamente associada com o uso de carrapaticidas, e com a presença de mutucas na fazenda. Tanto a ocorrência como a maior soroprevalência para *B. bovis* nas fazendas foram significativamente associadas com a presença recente de carrapatos nos bovinos. No geral, os resultados indicam que as fazendas amostradas estão situadas em área de instabilidade enzoótica para *A. marginale*, *B. bigemina*, e *B. bovis*, uma vez que a maioria dos animais foi soronegativa para pelo menos um dos agentes.

Palavras-chave: *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, bovino, fatores de risco, Brasil.

Introdução

Com mais de 200 milhões de bovinos, o Brasil tem o maior rebanho bovino comercial do mundo, a maioria exposta ao carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Na maioria das vezes, o *R. microplus* é a única espécie de carrapato que infestam os bovinos no Brasil (ARAGÃO, 1936; CAMPOS PEREIRA et al, 2000). Esta espécie de carrapato é o vetor principal da bactéria *Anaplasma marginale*, e os protozoários *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, o que pode contribuir para a prevalência geralmente elevada de tais agentes em todo o país. No entanto, a ocorrência de doenças causadas por estes agentes geralmente depende das condições climáticas de cada região. Na maior parte do país, a babesiose e a anaplasmoose bovina ocorrem endemicamente porque as condições ambientais fornecem uma carga moderada a elevada de *R. microplus* infestando os bovinos e o pasto ao longo do ano. Neste caso, os bovinos são geralmente infectados por *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* durante as primeiras semanas ou meses após o nascimento, permanecendo infectados (soropositivos) sem sofrer grave doença para o resto da sua vida (RIBEIRO; REIS, 1981; MADRUGA et al, 1984; 1985; PATARROYO et al, 1987; SANTOS et al, 2001). Por outro lado, as condições ambientais não são adequadas para *R. microplus* durante todo o ano em algumas áreas, como no sul do Brasil e no Uruguai, onde a média de temperatura é abaixo de 15 °C inibe o desenvolvimento do carrapato durante os meses de outono-inverno. Conseqüentemente, muitos animais não entram em contato com carrapatos infectados durante seus primeiros meses de vida, e posteriormente quando eles são primo-infectado, é comum a doença grave, com alta letalidade (NARI; SOLARI, 1991; MARTINS et al, 1994; GUGLIELMONE, 1995; MARANA et al, 2009).

O agente Africano da surra, *Trypanosoma vivax*, relatada pela primeira vez na América do Sul no início do século 20, é transmitido mecanicamente por moscas hematófagas, como tabanídeos e *Stomoxys calcitrans* (HOARE, 1972). Estas moscas são também incriminadas como vetores mecânicos de *A. marginale* (HAWKINS et al, 1982; KESSLER, 2001). No Brasil, *T. vivax* tem sido esporadicamente relatada infectando ruminantes, como relatado recentemente em três surtos que afetaram bovinos na região semiárida do estado da Paraíba (BATISTA et al, 2007; 2008).

O estado da Paraíba, localizado na região nordeste do Brasil, é caracterizado por um clima quente durante todo o ano. O Estado é geograficamente dividido em quatro

microrregiões principais, baseadas principalmente no tipo de vegetação e precipitação: (1) da Zona da Mata (Mata Atlântica), (2) Agreste, (3) do Cariri, e (4) Sertão (Fig. 1). A Zona da Mata e Agreste tem regimes relativamente mais elevados de precipitação (CABRERA; WILLINK, 1973). Ambos Cariri e Sertão (região semiárida) estão tipicamente dentro do bioma Caatinga, que abrange uma área de 900.000 km² (11% do território brasileiro) e é o único bioma que ocorre exclusivamente no Brasil. Caatinga é uma mata xerófila, que consiste principalmente de pequenas árvores espinhosas que perdem as folhas sazonalmente. Cactos, plantas de caule grosso e gramíneas adaptadas constituem o extrato herbáceo, no entanto, durante os períodos de seca, não há folhagem ou vegetação rasteira (ANDRADE-LIMA, 1981). O clima é caracterizado por ser quente e semiárido, a temperatura média de 27 °C e a precipitação média anual é tipicamente ≈ 500 mm. Existem tipicamente duas estações, uma estação chuvosa de fevereiro a maio, e um período de longa estiagem de junho a janeiro, porém, a ocorrência de secas, às vezes de mais do que um ano, é também uma característica da região (BATISTA *et al.*, 2007). Na verdade, este período de estiagem longo tem implicações importantes, ainda a ser avaliada em condições naturais, para os vetores de *A. marginale* e *Babesia* spp. na Caatinga.

Durante as últimas décadas, os bovinos de leite tornaram-se significativamente importantes para a população paraibana. Exceto para a região da Zona da Mata (onde as culturas de cana de açúcar prevalecem), a criação de gado em pequenas propriedades são comuns nas regiões do Agreste, Cariri e Sertão. Gramíneas cultivadas (principalmente *Brachiaria* spp.) são a base para a pecuária no Agreste, enquanto que no Cariri e Sertão os bovinos são geralmente criados extensivamente na Caatinga nativa. Até muito recentemente, a babesiose ou anaplasiose bovina permaneceram sem diagnóstico no bioma Caatinga do Estado da Paraíba. Um estudo recente do nosso grupo descreveu 24 surtos de anaplasiose e/ou babesiose bovina em fazendas na região do Sertão (COSTA *et al.*, 2011). Estes surtos afetaram principalmente vacas, com uma letalidade média de 36% (intervalo: 0-100%), o que indica que muitas das vacas afetadas não eram imunes, ou seja, não tinham sido previamente infectadas com os agentes *Babesia* ou *Anaplasma*. Aqui, nós investigamos pela primeira vez a soroprevalência de bovinos para *A. marginale*, *B. bigemina*, *B. bovis*, e *T. vivax* em fazendas da região semiárida da Paraíba, bem como os fatores de risco para esses agentes.

Material e Métodos

De julho de 2009 a julho de 2010, amostras de sangue foram coletadas de bovinos em 37 propriedades no estado da Paraíba, sendo 25 fazendas no Sertão, 9 na região do Cariri, e 3 nas regiões do Agreste (Fig. 1). Um total de 509 amostras de sangue foram obtidas. Em cada fazenda 5-30 vacas foram amostradas. Apenas pequenas propriedades com o tamanho do rebanho variando 8-180 bovinos foram investigadas. Durante visitas às fazendas, um questionário padronizado foi aplicado ao proprietário ou gerente de fazenda, a fim de obter informações para o estudo de fatores de risco. As variáveis independentes estudados são apresentadas na Tabela 1.

O soro de cada vaca foi testado pelo teste de imunofluorescência indireta (IFA), contra antígenos de *A. marginale* estirpe UFMG1, *B. bigemina* estirpe BbigMG, *B. bovis* estirpe BbovMG, e *T. vivax* estirpe Igarape-MG, como descrito anteriormente (BASTOS *et al.*, 2010; CUGLOVICI *et al.*, 2010). Para os primeiros três agentes, os antígenos consistiam de eritrócitos parasitados, obtidos a partir bezerros esplenectomizados que tinham sido inoculados experimentalmente (IICA, 1987). O antígeno de *T. vivax* consistiu de tripomastigotas fixos, obtidos a partir de uma cabra esplenectomizada e experimentalmente infectada (CUGLOVICI *et al.*, 2010). Os soros foram considerados positivos quando se observou reação específica para um dos quatro antígenos, na diluição de 1:80 de soro. Em cada reação, utilizaram-se soros de controles positivos e negativos de bovinos experimentalmente ou naturalmente infectados com cada um dos agentes (COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2006; BASTOS *et al.*, 2010; CUGLOVICI *et al.*, 2010).

As proporções de vacas sorologicamente positivos para *A. marginale*, *B. bigemina* ou *B. bovis* foram calculadas separadamente para cada fazenda. Para a análise de dados, uma regressão logística foi realizada para construir modelos multivariados que poderiam explicar as variáveis dependentes (vacas sorologicamente positivas para *A. marginale*, *B. bigemina* ou *B. bovis*) em função das 24 variáveis independentes a um nível dicotômico (ausência = 0; presença = 1) (Tabela 1). Os resultados sorológicos de cada exploração foram analisados em dois níveis dicotômicos distintos: em primeiro lugar, com a presença ou ausência de vacas sorologicamente positivas (sem vaca positiva = 0, pelo menos uma vaca positiva = 1) e, em segundo lugar, na proporção de vacas positivas na fazenda (menos de 25% das vacas positivas = 0, e mais de 25% das vacas positivas = 1).

As variáveis independentes foram submetidas à análise univariada e aquelas com associação estatística (aqui considerado como $P < 0,20$, teste do qui-quadrado, para esta primeira análise) foram testadas no modelo multivariado pelo método stepwise forward. As variáveis foram incluídas no modelo multivariado se mostrado significância estatística de $P < 0,05$, considerando-se também o nível de significância do modelo final. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SPSS para Windows (1999).

Resultados

Entre as 509 vacas amostradas, 211 (41,5%) eram soropositivas para pelo menos um dos agentes. Infecção simples foi observada em 170 (33,4%) vacas, sendo 53 positivas somente para *A. marginale*, 33 exclusivamente para *B. bigemina*, e 84 exclusivamente para *B. bovis*; infecção dupla foi observada em 34 (6,7%) vacas, sendo 24 tanto para *A. marginale* e *B. bovis*, e 10, tanto para *B. bigemina* e *B. bovis*; infecção tripla, isto é, a soropositividade para *A. marginale*, *B. bigemina*, *B. bovis* e, foi detectada em apenas 7 (1,4%) vacas. Todas as vacas foram soronegativas para *T. vivax*. Os valores globais de soroprevalência de acordo com as regiões geográficas são mostrados na Tabela 2.

O número médio de vacas amostradas por fazendas variou entre 5 a 30 (média: $13,8 \pm 6,2$). Valores médios de soroprevalência por fazendas foram $15,0 \pm 18,1\%$ (intervalo: 0-75%) para *A. marginale*, $9,5 \pm 12,5\%$ (intervalo: 0-40%) para *B. bigemina*, e $26,9 \pm 24,1\%$ (intervalo: 0 - 73,7%) para *B. bovis*. Entre as 37 fazendas amostradas, 14 (37,8%), 18 (48,6%) e sete (18,9%) tinham todas as vacas negativas para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* respectivamente. Um total de 10 (27%), 4 (10,8%), e 17 (45,9%) fazendas mostraram soropositividade acima de 25% para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* respectivamente.

Pela análise univariada, a presença de pelo menos uma vaca sorologicamente positiva para *A. marginale* foi estatisticamente associada ($P < 0,20$) com as variáveis n°. 3, 9, 18, 20, e 23 (Tabela 1). No entanto, quando essas variáveis independentes foram submetidas à análise multivariada, nenhuma foi significativa. Pela análise univariada, a presença de mais de 25% das vacas sorologicamente positivas para *A. marginale* foi estatisticamente associada ($P < 0,20$) com as variáveis n°. 2, 3, 4, 12, 13, 19, e 20. Quando essas variáveis independentes foram submetidas à análise multivariada, apenas o uso de menos de quatro pulverizações de carrapaticida por ano (n° 13), e mais de duas

aplicações de anti-helmínticos injetáveis por ano (nº. 19) foram associadas significativamente ($P < 0,05$) (Tabela 3).

Pela análise univariada, a presença de pelo menos uma vaca sorologicamente positiva para *B. bigemina* foi estatisticamente associada ($P < 0,20$) com as variáveis nº. 12, 14, 18, e 23. Quando essas variáveis independentes foram submetidas à análise multivariada, apenas o uso de pulverização para aplicação acaricida (nº 12), e a presença da mosca-dos-chifres nas fazendas (nº 14) foram associados significativamente ($P < 0,05$) (Tabela 3). Pela análise univariada, nenhuma variável independente foi associada ao nível de significância $P < 0,20$, com uma prevalência superior a 25% para *B. bigemina*.

Pela análise univariada, a presença de pelo menos uma vaca sorologicamente positiva para *B. bovis* foi estatisticamente associada ($P < 0,20$) com as variáveis nº. 6, 8, 9, 11, 12, e 13. Quando essas variáveis independentes foram submetidas à análise multivariada, apenas as observações recentes de carrapatos em bovinos (nº 9) foram significativas ($P < 0,05$) (Tabela 3). Pela análise univariada, a presença de mais de 25% das vacas sorologicamente positivas para *B. bovis* foi estatisticamente associada ($P < 0,20$) com as variáveis nº. 4, 9, 11, e 13. Quando essas variáveis independentes foram submetidas à análise multivariada, apenas as observações recentes de carrapatos em bovinos (nº 9) foram significativas ($P < 0,05$) (Tabela 3).

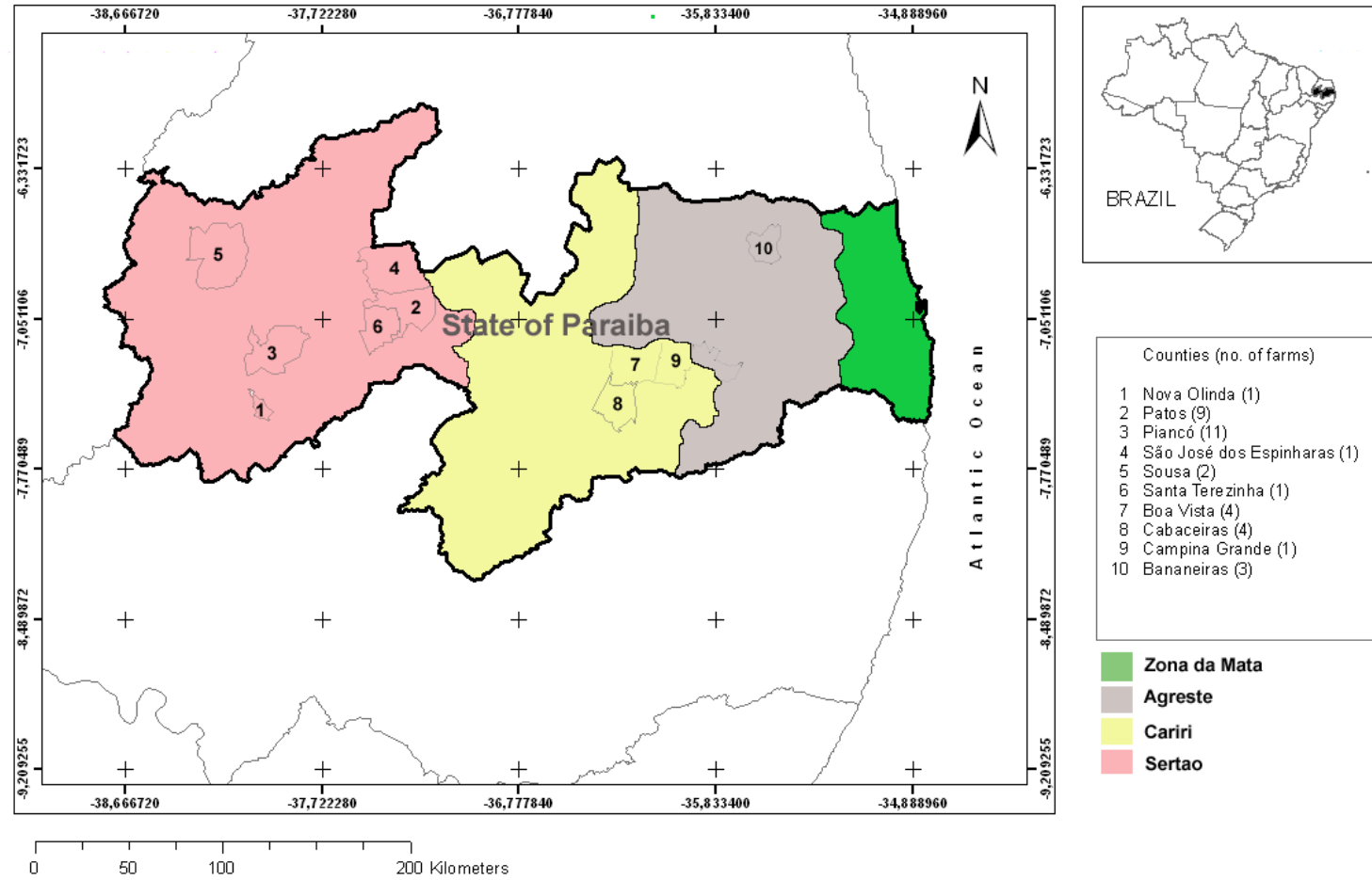


Figura 1. Número de fazendas por município de acordo com as regiões geográficas do Estado da Paraíba, nordeste do Brasil.

Tabela 1. Categoria dicotômica de cada variável independente usada na análise estatística de soropositividade de vacas para *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* no Estado da Paraíba, Brasil.

Nº	Variáveis independentes	Código 0*	Código 1*
1	Região	Sertão [25]	Cariri ou Agreste [12]
2	Tamanho da propriedade	≤64 ha [21]	>64 ha [16]
3	Tamanho do rebanho	≤45 bovinos [19]	>45 bovinos [18]
4	Nº de vacas na fazenda	≤15 [24]	>15 [13]
5	Raça predominante	Mestiço ou Zebu [31]	Europeu [6]
6	Tipo de exploração	Mista ou carne [8]	Leite [29]
7	Tipo de pastagem predominante	Nativa [19]	Cultivada [18]
8	Irrigação artificial de pastagens	Não [25]	Sim [12]
9	Observação recente de carrapatos [#]	Não [6]	Sim [31]
10	Carrapato durante todo o ano	Não [23]	Sim [14]
11	Controle de carrapato com acaricidas	Não [7]	Sim [30]
12	Método de aplicação acaricida	Outras [11]	Pulverização [26]
13	Nº de banhos acaricidas por ano	<4 [12]	≥4 [25]
14	Presença de mutucas (Tabanidae)	Não [10]	Sim [27]
15	Presença de mosquitos	Não [10]	Sim [27]
16	Presença de moscas-dos-chifres	Parte do ano [32]	Todo o ano [5]
17	Uso de controle químico para moscas	Não [27]	Sim [10]
18	Uso de antihelmínticos injetáveis	Não [6]	Sim [31]
19	Nº de aplicação antihelmíntica por ano	≤2 [26]	>2 [11]
20	Uso de vacinação anti-rábica nos últimos 2 anos	Não [6]	Sim [31]
21	Uso individual de agulhas descartáveis	Não [16]	Sim [21]
22	Introdução recente de bovinos no rebanho	Não [21]	Sim [16]
23	Nº de animais introduzidos	≤2 [31]	>2 [6]
24	Carrapatos nos animais introduzidos	Não [26]	Sim [11]

* números entre parêntesis refere-se ao número de explorações com a condição dada para cada variável.

[#] Todos os carrapatos encontrados em bovinos foram identificados taxonomicamente como *Rhipicephalus microplus* durante visitas às fazendas.

Tabela 2. Resultados do teste de imunofluorescência (IFA) realizada com antígenos para *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Trypanosoma vivax* no soro sanguíneo de vacas de três regiões geográficas do estado da Paraíba, nordeste do Brasil.

Região	Nº. de vacas testadas	Nº de vacas sorologicamente positivas [% (nível de confiança)]			
		<i>A. marginale</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bovis</i>	<i>T. vivax</i>
Sertão	342	56 [16.4 (12.6-20.7)]	32 [9.3 (6.5-12.9)]	75 [21.9 (17.6-26.7)]	0 [0]
Cariri	115	25 [21.7 (14.6-30.4)]	11 [9.6 (4.9-16.5)]	39 [33.9 (25.3-43.3)]	0 [0]
Agreste	52	3 [5.8 (1.2-15.9)]	7 [13.5 (5.6-25.8)]	11 [21.1 (11.1-34.7)]	0 [0]
Total	509	84 [16.5 (13.4-20.0)]	50 [9.8 (7.4-12.6)]	125 [24.5 (20.9-28.5)]	0 [0]

Tabela 3. Resultados das análises multivariadas entre vacas sorologicamente positivos para *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* ou *Babesia bovis* e variáveis independentes. Cada variável dependente foi analisada com variáveis independentes que foram previamente selecionadas nas análises univariadas, considerando $P < 0,20$.

Variáveis Independentes	Nº Fazendas	Nº de fazendas positivas (%)	Odds ratio	95% CI (odds ratio)	Valor - P
<i>variável dependente: fazendas com >25% de vacas sorologicamente positivas para A. marginale</i>					
Nº pulverização acaricida por ano					
<4	12	6 (50.0)			
≥4	25	4 (16.0)	14.3	1.5 – 138.0	0.021
Nº antihelmínticos injetáveis por ano					
≤2	26	5 (19.2)			
>2	11	5 (45.5)	10.9	1.1 – 108.7	0.041
<i>variável dependente: fazenda com pelo menos 1 vaca sorologicamente positiva para B. bigemina</i>					
Métodos de caplicação acaricida					
Outros	11	3 (27.3)			
Pulverização	26	16 (61.5)	7.5	1.3 – 42.5	0.023
Presença de mutucas (Tabanidae) na fazenda					
Não	10	2 (20.0)			
Sim	27	17 (63.0)	11.4	1.7 – 76.2	0.012
<i>variável dependente: fazenda com pelo menos 1 vaca sorologicamente positiva para B. bovis</i>					
Observação recente de carrapatos nos bovinos					
Não	6	2 (33.3)			
Sim	31	28 (90.3)	18.7	2.3 – 148.4	0.006
<i>variável dependente: : fazendas com >25% de vacas sorologicamente positivas para B. bovis</i>					
Observação recente de carrapatos nos bovinos					
Não	6	0 (0.0)			
Sim	31	17 (54.8)	*	*	0.022

*Não foi possível calcular o *odds ratio* porque um dos valores foi zero.

Discussão

Baseado no modelo epidemiológico conceitual clássico, o risco de surtos de babesiose e anaplasnose pode ser indiretamente medidos através da determinação da proporção de bovinos de idade conhecida tendo atividade anti-*Babesia* spp. e anti-*A. marginale* (MAHONEY; ROSS, 1972; ALONSO *et al.*, 1992; GUGLIELMONE *et al.*, 1997). Neste caso, a exposição primária de vetores infectados é desejada em bezerros de até 7-9 meses de idade, quando eles são naturalmente resistentes aos efeitos clínicos, e desenvolvem uma imunidade duradoura durante pelo menos 2 anos. Rebanhos bovinos sob esta condição são considerados em estabilidade enzoótica para babesiose ou anaplasnose (MAHONEY; ROSS, 1972). Por outro lado, em fazendas onde a exposição primária de vetores infectados não ocorre em bezerros com menos de 9 meses de idade, os rebanhos de gado são considerada sob instabilidade enzoótica para babesiose ou anaplasnose porque mais bovinos adultos, soronegativos tornam-se altamente suscetíveis aos efeitos clínicos de babesiose ou anaplasnose e, conseqüentemente, a fazenda está em risco de surtos destas doenças (MAHONEY; ROSS, 1972).

No geral, nossos resultados indicam que as fazendas amostradas no presente estudo podem estar sob instabilidade enzoótica para *A. marginale*, *B. bigemina* ou *B. bovis*, pois a maioria dos animais são soronegativos para pelo menos um agente. Esta condição é corroborada por recentes surtos de anaplasnose e a babesiose relatado em 24 fazendas na região do Sertão da Paraíba (COSTA *et al.*, 2011), que incluiu algumas das fazendas amostradas no presente estudo (dados não mostrados). Estes surtos, que ocorreram de 2007 a 2009, foram associados com chuvas atipicamente altas favorecendo a maior abundância do vetor e, conseqüentemente, maior exposição de animais sensíveis aos vetores infectados, ambos os carrapatos (no caso de *Babesia* spp. e *A. marginale*), e moscas hematófagas (no caso de *A. marginale*) (COSTA *et al.*, 2011).

Os valores da soroprevalência nos bovinos para *B. bovis* foram 2 a 3 vezes maiores do que para *B. bigemina*, embora ambos os agentes geralmente sejam encontrados em baixas percentagens na região de estudo, com a maioria das vacas soronegativas. Mahoney e Ross (1972) relataram que se populações de carrapatos são reprimidas ou por condições naturais ou artificiais, o gado não pode ser exposto carrapatos infectados com a *Babesia* spp. porque seus números sob condições naturais são extremamente baixos. Isso deve explicar os valores globais de baixa soroprevalência

encontrados no presente estudo, em que apenas 14 fazendas (37,8%) relataram infestações de carrapatos durante todo o ano (Tabela 1). Além disso, a primo-infecção por *B. bovis* tende a durar por um período muito mais longo do que a primo-infecção por *B. bigemina* (MAHONEY; ROSS, 1972), maior soroprevalência para *B. bovis* deve ser esperada em áreas marginais como o semiárido Paraibano, onde o gado exposto a carrapatos infectados com *Babesia* spp. pode não ser frequente; portanto, animais primo-infectados com *B. bigemina* podem se tornar soronegativos antes de ser reinfestados por carrapatos infectados com *B. bigemina*.

Três surtos de tripanossomíase bovina devido ao *T. vivax* foram recentemente relatados em fazendas distintas na região do Sertão da Paraíba, entre 2002 e 2006 (BATISTA et al, 2007;. 2008). Embora a origem do primeiro surto, em 2002, ainda seja desconhecida, os dois surtos subsequentes (2005 e 2006) foram associados ao movimento de bovinos entre essas fazendas (BATISTA et al., 2008). Esses surtos ocorreram no norte do estado da Paraíba, cerca de 70 km da fazenda amostradas no presente estudo, que foram localizados nos municípios de Sousa e São José do Espinharas. Não foi encontrada nenhuma evidência sorológica de infecção por *T. vivax* em bovinos, o que nos levou a concluir que este parasita não é muito difundido no Estado, onde ele pode ter encontrado barreiras ecológicas para a propagação, tais como a ausência de vetores durante o período de seca geralmente longa. No entanto, é importante alertar para os riscos eminentes de novos surtos de tripanossomíase bovina na região do Sertão da Paraíba, onde muitos rebanhos permanecem altamente suscetíveis.

Os valores mais elevados de soroprevalência por fazendas (> 25%) para *A. marginale* foram significativamente associados com uma menor frequência de pulverização acaricida (<4) por ano, uma condição que pode estar relacionado à maior exposição de bovinos a carrapatos, mas também a uma maior exposição a moscas que hematófagas, uma vez que a maior parte dos acaricidas comerciais são piretróides sintéticos, que são repelentes de mosca potentes (MENCCKE, 2006). Moscas hematófagas podem desempenhar um papel importante na transmissão mecânica de *A. marginale* na região. A transmissão experimental de *A. marginale* por tabanídeos foi realizada com sucesso. Observou-se também que a mosca-dos-chifres pode permanecer mecanicamente infectada durante pelo menos 2 horas depois de uma refeição de sangue em um animal infectado (HAWKINS et al., 1982). De fato, alguns autores consideram a transmissão mecânica de *A. marginale* por moscas hematófagas mais importantes do

que a transmissão biológica por carrapatos, sob certas condições, especialmente por causa da falta de transmissão transovariana de *A. marginale* em carrapatos *R. microplus* (UILENBERG, 1970; RIBEIRO; LIMA, 1996), assim como pela incapacidade de algumas estirpes de *A. marginale* para infectar carrapatos, incluindo o *R. microplus* (GONÇALVES RUIZ et al., 2005). Soroprevalências mais elevadas de *A. marginale* também foram associadas com diversas aplicações (> 2) de anti-helmínticos injetáveis por ano; esta observação pode estar relacionada à transmissão iatrogênica de *A. marginale*, que tem sido relatada como sendo uma via de transmissão importante deste agente entre bovinos no Brasil (KESSLER, 2001).

A presença de pelo menos uma vaca sorologicamente positiva para *B. bigemina* na propriedade foi significativamente associada com a utilização de pulverização para aplicação de acaricida. Embora esta associação possa parecer inesperada, à primeira vista, pode-se inferir que as fazendas que fizeram tratamento nos bovinos devem ter maiores infestações de carrapatos. No Brasil, a grande maioria dos agricultores utilizam pulverizadores costais manuais para aplicação de carrapaticidas em bovinos, que geralmente resultam em uma má aplicação em condições de campo e, conseqüentemente, no controle ineficiente do carrapato (AMARAL et al., 2011). No presente estudo, todos os agricultores que relataram pulverizar os animais também relataram usar pulverizadores costais (dados não mostrados), portanto, a aplicação ineficiente e o pobre controle do carrapato não suprem as chances dos bovinos serem expostos a carrapatos infectados com *B. bigemina*. A presença de vacas infectadas por *B. bigemina* também foi associada com a presença da mosca-dos-chifres na propriedade. Como *R. microplus* é o único vetor conhecido no Brasil de *B. bigemina* (GUGLIELMONE, 1995), podemos inferir que a presença visível de tabanídeos nas fazendas pode estar relacionada a condições ambientais adequadas não só para as mosca-dos-chifres, mas também para carrapatos, como áreas úmidas que forneceriam criadouros para tabanídeos, também poderia favorecer as pastagens uma cobertura vegetal adequada para a reprodução de carrapato. Por fim, tanto a ocorrência e maior soroprevalência de *B. bovis* nas fazendas foram significativamente associadas com observações recentes de carrapatos em bovinos, que é uma associação esperada porque *R. microplus* é o único vetor conhecido no Brasil de *B. bovis* (GUGLIELMONE, 1995).

Em conclusão, o presente estudo mostra que, em uma região do Estado da Paraíba, onde o clima semiárido e quente predomina, a babesiose e anaplasiose bovina ocorrem sob instabilidade enzoótica (\leq soroprevalência de 75%). Embora a nossa

amostragem (37 fazendas de bovinos), que foram selecionados aleatoriamente de acordo com razões logísticas, estatisticamente não representa toda a diversidade de situações no Estado, os resultados obtidos a partir das 37 fazendas foram muito coerentes em relação aos resultados sorológicos, ou seja, com poucas exceções, a maioria dos animais nas fazendas era soronegativas para *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*. O clima característico (período de seca prolongada) e tipo de vegetação (Caatinga) da região parecem estar relacionados com esta instabilidade enzoótica, à semelhança das condições relatadas para o bioma semiárido do Chaco, no norte da Argentina (GUGLIELMONE *et al.*, 1997). Assim, a adoção da vacinação anual de bezerros pode ser uma boa prática para evitar surtos de babesiose ou anaplasiose em fazendas no bioma Caatinga do estado da Paraíba. Essa prática tem sido adotada no sul do Brasil, onde a instabilidade enzoótica também prevalece.

Agradecimentos

Agradecemos Alberto Rodrigues L. por seu apoio técnico durante o trabalho de campo. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- Alonso M, Arellano-Sota C, Cereser VH, Cordoves CO, Guglielmono AA, Kessler R, Mangold AJ, Nari A, Patarroyo JH, Solari MA, Vega CA, Viscaíno O, Camus E. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Rev sci tech Off Int Epiz* 1992; 11: 713-733.
- Amaral MAZ, Rocha CMBM, Faccini JL, Furlong J, Monteiro CMO, Prata MCA. Perceptions and attitudes among milk producers in Minas Gerais regarding cattle tick biology and control. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20: 194-201.
- Andrade-Lima D. The Caatinga dominium. *Rev bras Bot* 1981; 4: 149-153.
- Aragão H. Ixodidas brasileiros e de alguns paizes limitrophes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1936; 31: 759-843.
- Bastos CV, Passos LM, Facury-Filho EJ, Rabelo EM, de la Fuente J, Ribeiro MF. Protection in the absence of exclusion between two Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* in experimentally infected calves. *Vet J* 2010; 186: 374-378.

- Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MMG, Madruga CR, Simões SDV, Maia TF. Trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Vet Parasitol* 2007; 143: 174–181.
- Batista JS, Bezerra FSB, Lira RA, Carvalho JRG, Rosado Neto AM, Petri AA, Teixeira MMG. Clinical, epidemiological and pathological signs of natural infection in cattle by *Trypanosoma vivax* in Paraíba, Brazil. *Pesq Vet Bras* 2008; 28: 63–69.
- Cabrera AL, Willink A. *Biogeografia de America Latina*. Washington, D.C.: Organización de los Estados Americanos; 1973.
- Campos Pereira M, Labruna MB, Szabo MPJ, Klafke GM. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus - Biologia, Controle e Resistência*. São Paulo: MedVet Livros; 2008.
- Costa VMM, Rodrigues AL, Medeiros JMA, Labruna MB, Simões SVD, Riet-Correa F. Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. *Pesq Vet Brás* 2011; 31: 239-243.
- Cuglovici DA, Bartholomeu DC, Reis-Cunha JL, Carvalho AU, Ribeiro MF. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. *Vet Parasitol* 2010; 169: 320-326.
- Gonçalves Ruiz PM, Passos LM, Ribeiro MF. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. *Vet Parasitol* 2005; 128: 325-331.
- Guglielmone AA. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol* 1995; 57: 109-119.
- Guglielmone AA, Echaide ST, Pérez y Santaella M, Iglesias JA, Vanzini VR, Lugaresi CI, Dellepiane EL. Cross-sectional estimation of *Babesia bovis* antibody prevalence in an area of Argentina used for extensive cattle breeding as an aid to control babesiosis. *Prev Vet Med* 1997; 30: 151-154.
- Hawkins JA, Love JN, Hidalgo RJ. Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: Tabanidae). *Am J Vet Res* 1982; 43: 732-734.
- Hoare CA. *The trypanosomes of mammals: a zoological monograph*. Oxford: Blackwell; 1972.
- IICA. *Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina*, San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para a Agricultura; 1987.
- Kessler RH. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesq Vet Bras* 2001; 21: 177-179.

- Madruga CR, Braga MM, Oliveira DB, Masard CL, Soares CO. Prevalência de anticorpos contra *Babesia bovis* (Babés, 1888) e *B. bigemina* (Smith e Kilborne, 1893) (Apicomplexa: Babesiidae) em bovinos de quatro municípios do estado do Rio de Janeiro. *R bras Ci Vet* 2000; 7: 113-116.
- Madruga CR, Aycardi E, Kessler RH, Schenk MAM, Figueiredo GR, Curvo JBE. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, em bezerros em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesq Agropec bras* 1984; 19: 1163-1168.
- Madruga CR, Kesler RH, Gomes A, Schenk MAM, Andrade DF. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesq Agropec bras* 1985; 20: 135-142.
- Mahoney DF, Mirre GB. Bovine babesiosis: estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Ann Trop Med Parasitol* 1971; 65: 309-317.
- Mahoney DF, Ross DR. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust Vet J* 1972; 48: 292-298.
- Marana ERM, Dias JA, Freire RL, Vicentini JC, Vidotto MC, 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. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18: 20-26.
- Martins JR, Correa BL, Ceresér VH, Arteché CCP, Guglielmone AA. Some aspects of the epidemiology of *Babesia bovis* in Santana do Livramento, southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 1994; 3: 75-78.
- Mencke N. Acaricidal and repellent properties of permethrin, its role in reducing transmission of vector-borne pathogens. *Parassitologia* 2006; 48: 139-140.
- Nari A, Solari MA. Epidemiología y control del *Boophilus microplus* en Uruguay. Su relación con *Babesia* spp. *Rvta Cub Cienc Vet* 1991; 22: 149-160.
- Patarroyo JHS, Ribeiro MFB, Santos JL, Faria JE. Epidemiologia das babesioses bovinas no Estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos fluorescentes na Zona da Mata, MG. *Arq Bras Med Vet Zoot* 1987; 39: 423-429.
- Ribeiro MFB, Reis R. Prevalência da anaplasmosse em quatro regiões do Estado de Minas Gerais. *Arq Esc Vet UFMG* 1981; 33: 57-62.

- Ribeiro MF, Lima JD. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 1996; 61: 31-39.
- Santos HQ, Linhares GFC, Madruga CR. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos de leite da microregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e Elisa. *Ciência Animal Brasileira* 2001; 2: 133-137.
- SPSS for Windows. *SPSS Base 9.0.1. Users guide*. Chicago: SPSS Inc.; 1999.
- Trindade HI, Silva GRA, Teixeira MCA, Sousa MG, Machado RZ, Freitas FLC, Almeida KS. Detection of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in calves from the region of Araguaína, State of Tocantins, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2010; 19: 169-173.
- Uilenberg G. Notes sur les babésioses et l'anaplasmose des bovins à Madagascar. IV. Note additionnelle sur la transmission. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* 1970; 23: 309-312.

CAPÍTULO III

INCIDÊNCIA DA INFECÇÃO POR *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* E *Babesia bovis* EM BOVINOS DURANTE O PRIMEIRO ANO DE VIDA EM FAZENDAS DO SEMIÁRIDO PARAIBANO.

O presente trabalho foi formatado nas normas da Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (anexo 4). O artigo foi submetido em 08 de março de 2013 (anexo 7).

Incidência da infecção por *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bovinos durante o primeiro ano de vida em fazendas do semiárido paraibano.

Incidence of infection with *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* among one-year old calves in farms of the semiarid region of Paraíba.

Valéria Medeiros de Mendonça Costa¹, Múcio Flávio Barbosa Ribeiro², Amélia Lizziane Leite Duarte¹, Giuliana Amélia Freire¹, Olívia Maria Moreira Borges¹, André Flávio Almeida Pessoa¹, Sergio Santos Azevedo¹, Antonio Thadeu Medeiros de Barros³, Franklin Riet-Correa¹, Marcelo Bahia Labruna⁴

¹ Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, Brasil.

² Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Corumbá, MS, Brasil.

⁴ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil.

* **Corresponding author:** Marcelo Bahia Labruna. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil. e-mail: labruna@usp.br

Abstract

The incidence of natural infections by *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* was monitored, each 14 days, from one to 12months-old calves in 5 farms in semiarid region of Paraíba. By the polymerase chain reaction of the 41 calves studied, 25 were positive for *A. marginale*, 7 for *B. bigemina*, and 3 for *B. bovis*. The

incidence of infection by *A. marginale* was 0%, 83.3%, 85.7, 100% and 100%. Infections by *B. bigemina* occurred on two farms with incidence 12.5% and 85.7%, respectively. Infection by *B. bovis* was observed only in one farm with an incidence of 42.8%. A total of 29 calves showed no infection by any of the agents studied. The incidence of antibodies against *A. marginale* detected by indirect immunofluorescence (IFA) was 0%, 50%, 42.8%, 14.3%, and 28.6%, in the 5 farms, respectively. Seropositivity to *B. bigemina* and *B. bovis* was found in only one farm, with an incidence of 57.1% and 71.4%, respectively. In one farm all the 14 calves studied remained seronegative for *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis*. According to serological criteria, four farms of this study had conditions of enzootic instability for tick fever and in another no presence of any of the three agents of tick fever was detected. These results confirm data from a previous study that infection by *A. marginale* is more frequent than infections by *Babesia* spp. The PCR was a more sensitive method than the IFA for diagnosis of infection by *A. marginale*. On 3 farms, 10 different species of the Tabanidae family were captured and the highest peaks of capture coincided with the highest rain falls in two distinct regions, the sertão and the cariri. Analyses for DNA sequencing of PCR amplified products showed that at least three distinct haplotypes of *A. marginale* are circulating among cattle in semiarid region of Paraíba. Only one genotype of *B. bigemina* was found in the cattle and tick samples sequenced. These results demonstrate that even evaluating only five farms, tick fever agents occurred heterogeneously in the region, confirming the status of enzootic instability previously reported for the semiarid region of Paraíba.

Keywords: Incidence, calves, *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, hematophagous diptera.

Resumo

A incidência de infecções naturais por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* foi investigada em bezerros a partir dos 30 dias de nascidos em 5 fazendas do semiárido paraibano. Dos 41 bezerros acompanhados durante o primeiro ano de vida 25 apresentaram reação de polimerase em cadeia (PCR) positiva para *A. marginale*, 7 para *B. bigemina* e 3 para *B. bovis*. As incidências para infecção por *A. marginale* foram de 0%, 83,3%, 85,7, 100% e 100%. A infecção por *B. bigemina* ocorreu em duas fazendas com, 12,5% e 85,7% de incidência respectivamente. A infecção por *B. bovis* foi

observada somente em uma propriedade com incidência de 42,8%. Um total de 29 bezerros não apresentaram soropositividade a nenhum dos agentes estudados. Na detecção de anticorpos pela imunofluorescência indireta (RIFI), os valores de incidência para infecção em bezerros por *A. marginale* para as 5 fazendas foram, respectivamente, de 0%, 50%, 42,8%, 14,3% e 28,6%. Soropositividade para *B. bigemina* e *B. bovis* foi observada apenas em uma propriedade, com incidência de 57,1% e 71,4%, respectivamente. Em uma propriedade todos os 14 bezerros permaneceram soronegativos para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*. Os resultados sorológicos indicam que nenhuma fazenda está em condições de estabilidade enzoótica. Segundo os critérios sorológicos, as quatro propriedades rurais do presente estudo apresentavam condições de instabilidade enzoótica para TPB e em uma não houve presença de nenhum dos três agentes da TPB. Os resultados encontrados neste trabalho confirmam dados de um estudo anterior onde se observou serem mais frequentes as infecções por *A. marginale* do que por *Babesias* spp. A PCR mostrou-se um método mais sensível que a RIFI para diagnóstico de infecção por *A. marginale*. Em 3 fazendas, 10 diferentes espécies de tabanídeos foram capturados e os maiores picos de captura coincidiram com os maiores picos de chuvas em duas regiões distintas, sertão e cariri. As análises de sequenciamento de DNA de produtos amplificados por PCR mostraram que pelo menos três haplótipos distintos de *A. marginale* circulam entre os bovinos do semiárido paraibano e apenas um genótipo de *B. bigemina* foi encontrado nas amostras sequenciadas de bovinos e de carrapatos. Estes resultados demonstram que, mesmo avaliando apenas cinco propriedades rurais, a incidência dos agentes da TPB ocorreu de forma heterogênea na região, corroborando o status de área de instabilidade enzoótica previamente relatado para o semiárido paraibano.

Palavras-chave: Incidência, bezerro, *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, dípteros hematófagos.

Introdução

A TPB é considerada enzoótica no Brasil e a distribuição de *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* está relacionada à presença do carrapato vetor, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, presente em praticamente todo território nacional. Levantamentos soro-epidemiológicos têm demonstrado que ocorrem variações na frequência de bovinos infectados por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, com

áreas de estabilidade enzoótica e áreas de instabilidade (TRINDADE et al., 2010; SOUZA, 2011).

As áreas de estabilidade enzoótica são aquelas em que existe equilíbrio entre imunidade e doença, onde pelo menos 75% dos animais com idade acima de 9 meses são portadores de hemoparasitos. Isso significa que a maioria desses animais adquire a infecção ainda como bezerros (primo-infecção precoce até os 7-10 meses de idade). Essa infecção permanece assintomática nos animais mais velhos que são reinfetados continuamente pela população de *R. (B.) microplus*, que se mantém durante todo ano. Esta situação resulta em baixa mortalidade pelas hemoparasitoses em animais adultos (MADRUGA et al., 1993; SACCO, 2002). Em áreas endêmicas, os bezerros recebem proteção passiva de anticorpos presentes no colostro, aproximadamente até três meses de idade (JAMES et al., 1985). A proteção pode persistir por até 6 meses de idade para *B. bovis* e de três a quatro meses para *B. bigemina*. Após a primo-infecção, os animais permanecem sorologicamente positivos por um período de 6 meses para *B. bovis*, de três a quatro meses para a *B. bigemina* (WRIGHT et al., 1990). Quanto ao *A. marginale*, esse período é de 8 meses (MAGONIGLE; NEWBY, 1984).

Nas áreas de instabilidade enzoótica a porcentagem de infecção em animais acima de 9 meses está entre 20 e 75%, sendo esses níveis detectados mediante testes sorológicos. Nessas áreas, a ocorrência de uma estação seca ou fria impede o desenvolvimento da fase de vida livre do carrapato durante parte do ano. Assim, os bovinos passam uma época do ano sem ter contato com o parasita ou com poucos carrapatos, com isso não desenvolvem imunidade duradoura contra a doença. Nesses rebanhos a primo-infecção é verificada em idade avançada. Ocorrem surtos da doença em animais adultos e, conseqüentemente, altas taxas de mortalidade (MAHONEY; ROSS, 1972).

Assim o presente estudo teve como objetivo determinar a incidência de infecções naturais por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* em bezerros a partir dos 30 dias de nascidos em fazendas do semiárido paraibano.

Material e Métodos

Entre julho de 2010 a janeiro de 2012, este estudo foi desenvolvido em cinco propriedades rurais da Paraíba, sendo quatro na mesorregião do Sertão [São José dos Espinharas (A), Patos (C), Piancó (B e E)] e uma na mesorregião do Cariri Paraibano [Cabaceira (D)]. Em cada propriedade foram coletadas amostras de sangue venoso de 6

a 14 bezerros a partir dos 30 dias de vida. As coletas foram realizadas a cada 14 dias por um período de 12 meses. Durante a primeira coleta de sangue de cada bezerro foi coletado também, sangue das respectivas mães para realização de testes sorológicos. Foram selecionadas 10 vacas de cada propriedade para contagem e coleta de carrapatos; coletavam-se exclusivamente fêmeas ingurgitadas. A contagem era realizada de um dos lados do animal, incluindo virilha, úbere e axila, contavam-se carrapatos a partir de 4,5mm e ao término multiplicava-se por 2. Os bezerros também eram inspecionados para verificar se estavam parasitados por carrapatos. Em três fazendas (2 no sertão e 1 no cariri) foram colocadas armadilhas para coletas de dípteros hematófagos (NZI e CANNOPY) e culicídeos (CDC). As armadilhas eram montadas uma vez ao mês durante 8 dias, onde a cada dois dias os coletores eram substituídos por outro e o material coletado armazenado a seco, em recipientes contendo naftalina.

As amostras de sangue dos bezerros eram colhidas em dois tubos, um com EDTA e outro sem conservantes. Deste último, eram obtidos cerca de 1,5ml de soro para testes sorológicos. Do tubo com EDTA, uma parte era usada para determinação do volume globular pelo teste de microhematócrito, e outra parte era usada para extração de DNA, conforme descrito abaixo. Os carrapatos coletados nos animais foram colocados em estufa climatizada do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) durante 8 dias, para posterior avaliação da hemolinfa. Os carrapatos que apresentaram hemolinfa positiva para *Babesia* sp., foram armazenados em microtubos e mantidos congelados a -20°C para realização da técnica de PCR. Os dípteros coletados nas armadilhas foram armazenados em recipientes com naftalina para posterior identificação taxonômica.

As amostras de soro foram testadas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), contra antígenos de *A. marginale* estirpe UFMG1, *B. bigemina* estirpe BbigMG e *B. bovis* estirpe BbovMG (BASTOS et al, 2010). Para os três agentes, os antígenos consistiam de eritrócitos parasitados, obtidos a partir de bezerros esplenectomizados que tinham sido inoculados experimentalmente (IICA, 1987). Os soros foram considerados positivos quando ocorria reação específica para um dos três antígenos, na diluição de 1:80 de soro.

Para a extração de DNA de sangue total, utilizou-se o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA), conforme recomendações do fabricante, com padronização do volume da amostra para extração de 150µL de sangue total congelado (-20°C). Três protocolos de PCR, cada um almejando uma espécie de

hemoparasita com um par de *primers* espécie-específico, foram empregados. Os *primers* utilizados na reação de amplificação para *A. marginale* foram: senso (5'- CAA TCG TGA GGG ATA GCC TTG TAC-3') e antisenso (5'-TGG TAT CAC GGT CAA AAT CTT GCT-3'). Para *B. bovis* cada amostra de DNA foi testada com os *primers* senso (5'- CGA GGA AGG AAC TAC CGA TGT TGA ATA TC-3') e antisenso (5'- CAA CGT ACG AGG TCA AGC TAC CGA GCA G-3'), e na PCR para *B. bigemina*, cada amostra de DNA foi testada com os *primers* senso (5'- GGG ACG TCA AGC GAT TTT GAG ACG T-3') e antisenso (5'- GAG TGT TGC TGA TTG ACG ACC TAA GCG C-3'). Todas as reações foram realizadas nas mesmas condições de reagentes e ciclos térmicos. Para tal, cada tubo de reação consistiu num volume total final de 25µL, com uma mistura contendo 12,6 µL de água ultrapura, 2,5µL de tampão, 2,5µL de amostra de DNA de sangue total, 4,0µL de dNTPs, 0,75 µL de MgCl₂, 1,25µL de cada *primer* e 0,15 µL de enzima Taq-polimerase (Taq-Platinum, Invitrogen). As condições térmicas foram 95°C por 3 min., seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 seg., 58°C por 30 seg., 72°C por 30seg.; finalmente, houve uma extensão final a 72°C por 5 min. Esses três pares de *primers* foram desenhados no presente estudo, utilizando-se o programa Primer Express Software Version 3.0 (Applied Biosystems). A sensibilidade e especificidade dos primers foram testadas utilizando-se amostras de DNA de sangue bovino sabidamente infectado com cada um dos três patógenos alvos (*A. marginale*, *B. bigemina* ou *B. bovis*). Em nenhum momento, houve reação cruzada entre os três patógenos nos 3 diferentes protocolos de PCR, mostrando-se ser, portanto, 100% específico (dados não publicados).

O produto amplificado na PCR foi visualizado em gel de Agarose a 1,5%, submetido à eletroforese em cuba horizontal com fonte de 100V e corado com Brometo de Etídio. A leitura foi realizada após 15 minutos em transiluminador de luz ultravioleta, com posterior documentação fotográfica. Foram consideradas positivas as amostras que produto amplificado de aproximadamente 300 pares de bases, correspondente ao mesmo padrão de migração da banda geradas pelo controle positivo correspondente.

Os produtos de PCR de algumas amostras positivas na PCR foram purificados e submetidos ao sequenciamento de nucleotídeos em sequenciador automático de DNA (Applied Biosystems/Perkin Elmer, model ABI Prism 310 Genetic), conforme instruções do fabricante. As sequências obtidas foram submetidas ao programa "BLAST analysis"

(ALTSCHUL et al. 1990) para determinar similaridades com outras sequências disponíveis.

Durante os meses do experimento foram coletados os dados climáticos de umidade relativa do ar, temperatura e índices pluviométricos para cada local ou mesorregião amostrada. Os dados foram obtidos através do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER-Patos) e da Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba (AESAs).

Os valores de hematócrito dos bezerros foram comparados com os resultados de PCR através do teste *t* de Student, com o intuito de verificar se as amostras positivas na PCR para *A. marginale*, *B. bigemina* ou *B. bovis* apresentavam menores valores de hematócrito, quando comparadas com as amostras negativas. As análises foram realizadas através do programa Minitab 16. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes se $P < 0,05$.

Para a comparação dos resultados da sorologia com os da PCR, foram calculados sensibilidade, especificidade, concordância e indicador Kappa, com nível de confiança de 95%, utilizando o programa Dag Stat (MACKINNON, 2000), e teste de hipóteses realizado com o teste de McNemar para amostras relacionadas.

Resultados

Dos 41 bezerros acompanhados durante o primeiro ano de vida 25 apresentaram PCR positivo para *A. marginale*, 7 para *B. bigemina* e 3 para *B. bovis*. Casos de infecção simples por *A. marginale* foram observados em 18 bezerros, infecção mista por *A. marginale* e *B. bigemina* ocorreram em 4 animais, infecção tripla em 3 animais e 16 animais não apresentaram infecção à nenhum dos agentes estudados. Os valores de incidência para infecção por *A. marginale* variou de 83,3% a 100% em quatro fazendas (Tabela 1). No entanto, todos os 14 bezerros acompanhados na fazenda A permaneceram negativos para *A. marginale*. Os bezerros das propriedades A, B e C foram negativos para *B. bigemina*, e as propriedades D e E apresentaram valores de incidências de 12,5% e 85,7%, respectivamente (Tabela 1). A infecção por *B. bovis* foi observada somente em uma propriedade com percentual de incidência de 42,8%. Os animais da propriedade E foram infectados pelos três agentes, enquanto a propriedade A não apresentou animais infectados para nenhum dos agentes. Nos testes sorológicos dos 41 bezerros acompanhados durante o primeiro ano de vida, 9 apresentaram RIFI

positiva para *A. marginale*, 4 para *B. bigemina* e 5 para *B. bovis*. Sete bezerros foram soropositivos apenas para *A. marginale* e um apenas para *B. bovis*. Soropositividade dupla (para *B. bigemina* e *B. bovis*) ocorreu em dois bezerros, e outros dois bezerros apresentaram soropositividade tripla (para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*). Um total de 29 bezerros não apresentaram soropositividade a nenhum dos agentes estudados. Pela RIFI, os valores de incidência para infecção por *A. marginale* para as fazendas A, B, C D e E foram, respectivamente, de 0%, 50%, 42,8%, 14,3% e 28,6%. Soropositividade para *B. bigemina* e *B. bovis* foi observada apenas na propriedade E, com incidência de 57,1% e 71,4%, respectivamente. Na propriedade A todos os 14 bezerros permaneceram soronegativos para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*. Com exceção de dois bezerros que foram positivos para *B. bovis* apenas pela RIFI, os demais 10 animais positivos pela RIFI, seja para *A. marginale*, *B. bigemina* ou *B. bovis*, foram também positivos pela PCR correspondente ao agente pesquisado. Nos animais que foram positivos pra um agente específico pelos dois métodos de diagnóstico, a positividade da PCR antecedeu a da RIFI em intervalos que variaram de 4 a 30 semanas. As únicas exceções foram 2 bezerros em que a soropositividade a *B. bovis* antecedeu à PCR em 6 a 8 semanas, e um bezerro em que a soropositividade a *B. bigemina* antecedeu à PCR em 4 semanas.

As amostras de sangue coletadas das vacas durante a primeira visita a cada propriedade mostraram-se todas negativas pela RIFI. A presença de carrapatos *R. (B.) microplus* foi verificada apenas nas propriedades D e E, sendo que as contagens de carrapatos realizada nas vacas variaram de 4 a 132 fêmeas por animal. Nos bezerros a variação na contagem foi de 2 a 66 carrapatos. Infecção por *B. bigemina* e *B. bovis* só foi observada nas propriedades D e E, propriedades estas que também foram as únicas a se verificar a presença do *Rhipicephalus (B.) microplus*.

O total mensal de tabanídeos capturados nas propriedades A, D e E estão apresentados na Fig. 1. Foram identificadas os seguintes taxons, em ordem decrescente de espécimes capturados: *Tabanus claripenis* (658 espécimes), *Tabanus* sp (130), *Lepiselaga crassipens* (112), *Tabanus occidentalis* (9), *Dichelacera* sp (7), *Lepiselaga* sp (4), *Chlorotabanus* sp (4), *Crysops* sp (3), *Stenotabanus* sp (2) e *Poeciloderas* sp (1). Durante o mesmo período, também foram capturados um total de 684 moscas da espécie *Stomoxys calcitrans*. Nos meses de mar/abr-10, out/nov-10, jan./fev-11, jul./ago-11 e out./nov-11, quando foram observados os maiores picos de tabanídeos na região do sertão (Fig. 1), observou-se um claro aumento da precipitação de chuvas (Fig.

2). Um similar padrão de picos de chuvas (Fig. 2), coincidente com picos de tabanídeos, foi também observado na região do cariri (Fig. 1). Os valores médios, desvio padrão e amplitude de hematócrito dos bezerros positivos e negativos na PCR para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* estão apresentados na Tabela 2. As amostras positivas na PCR, tanto para *A. marginale* como para *B. bigemina*, apresentaram valores de hematócrito significativamente menores que as amostras negativas na PCR. No caso de *B. bovis*, as médias do hematócrito foram estatisticamente similares ($P=0,07$) entre as amostras positivas e negativas na PCR. Dos produtos de PCR obtidos, algumas amostras de cada propriedade positiva foram aleatoriamente selecionadas para serem submetidas ao sequenciamento automático de DNA. As sequências obtidas foram editadas utilizando-se o algoritmo *Seqman* do programa DNASTar (Lasergene), tomando-se o cuidado de remover as extremidades correspondentes às sequências dos primers utilizados na PCR. As sequências editadas foram submetidas ao *Blast analysis*, a fim de verificar maiores similaridades com as sequências disponíveis no Genbank. Os resultados desses sequenciamentos estão apresentados nas Tabelas 3-5.

Durante o estudo, foram coletadas 46 fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* dos bovinos. Após serem incubadas para oviposição em estufa, em apenas duas fêmeas ingurgitadas, colhidas de bovinos na propriedade 5, foram encontradas formas de esporocinetos compatíveis com *Babesia* sp, através do exame de hemolinfa corado com Giemsa. Esses dois carrapatos foram submetidos aos mesmos protocolos de PCR citados acima, resultando em positividade apenas para a PCR para *B. bigemina*. Os produtos de PCR foram sequenciados, resultando em sequências 100% às identificadas em bezerros da propriedade E (Tabela 3). Quando comparada a sorologia à PCR, tendo esta última como padrão-ouro, observa-se que as especificidades foram boas para as três sorologias, no entanto, apenas a sorologia para *B. bovis* apresentou uma boa sensibilidade (Tabela 6). Analisando a sorologia como padrão-ouro (Tabela 7), as especificidades para *B. bigemina* e *B. bovis* foram boas, enquanto, a sensibilidade foi excelente apenas para *A. marginale* e *B. bigemina*, que foram de 100%.

Tabela 1. Incidência da infecção por *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* em bezerros durante o primeiro ano de vida em cinco fazendas da Paraíba, dentro do período de julho de 2010 a janeiro de 2012.

Fazenda	N° de bezerros amostrados de 14/14 dias durante o primeiro ano de vida	Numero de bezerros positivos que se infectaram, segundo a idade (em meses) da primeira detecção por PCR e valor da incidência (%) durante o primeiro ano de vida					
		<i>A. marginale</i>		<i>B. bigemina</i>		<i>B. bovis</i>	
		N° bezerros	%	N° bezerros	%	N° bezerros	%
A	14	0	0	0	0	0	0
B	6	5 (1,1,1,1,1,1)	83,3	0	0	0	0
C	7	6 (1,2,2,3,3,4)	85,7	0	0	0	0
D	7	7 (1,1,1,1,1,5,7)	100	1 (8)	12,5	0	0
E	7	7 (1,1,1,1,1,5,8)	100	6 (1,1,1,4,4,5)	85,7	3 (3,6,7)	42,8

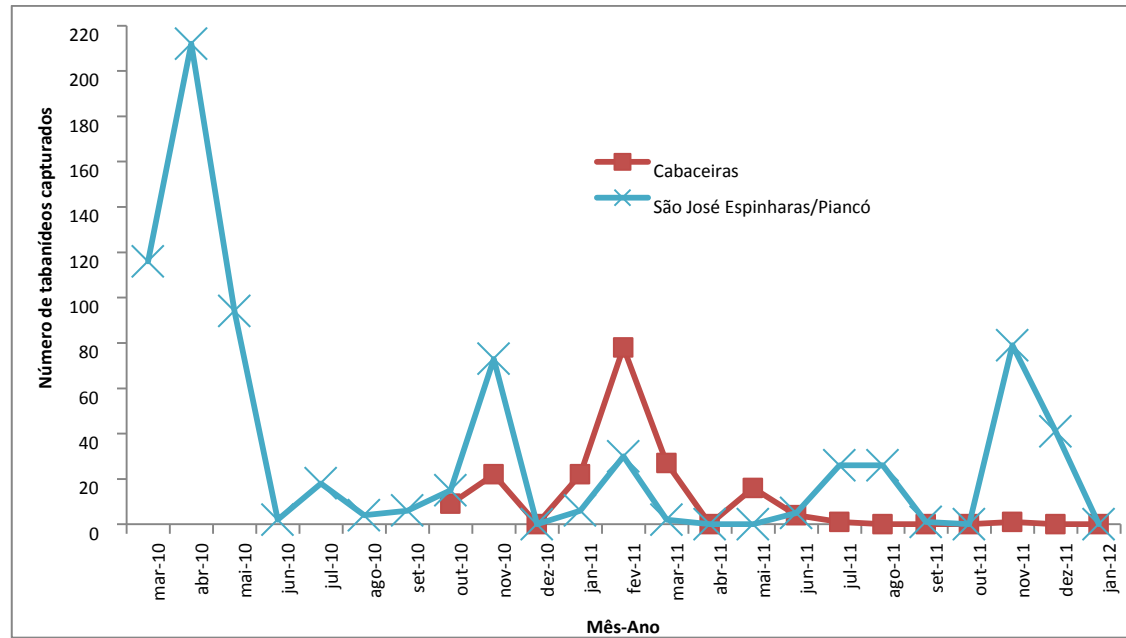


Figura 1. Número total de tabanídeos adultos capturados por armadilhas Canopy e NZI, armadas por um período de 8 dias consecutivos em cada mês, nas Fazendas A e B (São José de Espinharas/Piancó) e D(Cabaceiras), Paraíba, de março de 2010 a janeiro de 2012.

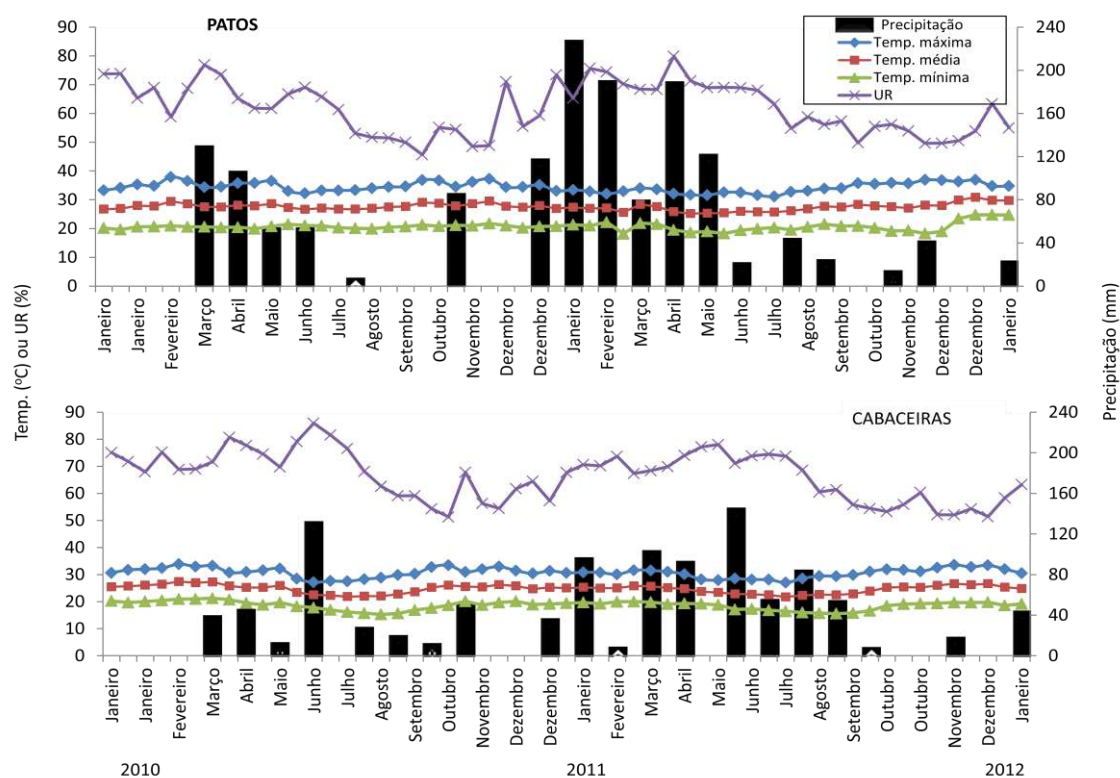


Figura 2. Valores médios de temperatura (temp.) máxima, média e mínima, umidade relativa e valor total mensal (precipitação) registrados para os municípios de Patos e Cabaceiras, Paraíba, de janeiro de 2010 a janeiro de 2012.

Tabela 2. Avaliação comparativa dos valores de hematócrito das amostras de sangue de bezerros, positivas (+) e negativas (-) na PCR para *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, em propriedades rurais do semiárido paraibano, de 2010 a 2012.

Hematócrito	<i>A. marginale</i> (4 fazendas)		<i>B. bigemina</i> (2 fazendas)		<i>B. bovis</i> (1 fazenda)	
	PCR+ (78)*	PCR- (84)*	PCR+(21)*	PCR- (114)*	PCR+ (12)*	PCR- (73)*
Média ⁺	28,5 ^a	35,5 ^b	23,9 ^a	31,7 ^b	23,2 ^a	24,8 ^a
Desvio padrão	7,2	5,8	4,7	4,4	2,2	4,3
Amplitude	11-47	26-54	18-34	21-40	20-27	18-38

*numero de amostras de sangue incluídas na análise, considerando-se somente as fazendas em que houve pelo menos um animal que se infectou pelo patógeno em questão.

⁺ letras sobre-escritas diferentes indicam que as médias de hematócrito entre amostras positivas e negativas na PCR foram estatisticamente diferentes ($P < 0.05$), considerando cada patógeno separadamente.

Tabela 3. Resultados de sequenciamento de DNA de produtos de PCR com primers direcionados a um fragmento de 340-pb do gene rap-1 de *Babesia bigemina*, em amostras de sangue de bezerros de fazendas da Paraíba.

Bezerro	Origem na Paraíba	Maior similaridade no Genbank (<i>Blast analysis</i>)			
		Numero de acesso	%	origem	cepa
2	Fazenda D	AY146980	100	Argentina	S1A
2	Fazenda E	AY146980	100	Argentina	S1A
4	Fazenda E	AY146980	100	Argentina	S1A
5	Fazenda E	AY146980	100	Argentina	S1A

Tabela 4. Resultados de sequenciamento de DNA de produtos de PCR com primers direcionados a um fragmento de 347-pb do gene rap-1 de *Babesia bovis*, em amostras de sangue de bezerros de fazendas da Paraíba.

Bezerro	Origem na Paraíba	Maior similaridade no Genbank (<i>Blast analysis</i>)			
		Numero de acesso	%	origem	cepa
4	Fazenda E	FJ588012	100	Brasil	Sudeste
5	Fazenda E	FJ588010	100	Brasil	Nordeste
6	Fazenda E	FJ588010	100	Brasil	Nordeste

Tabela 5. Resultados de sequenciamento de DNA de produtos de PCR com primers direcionados a um fragmento de 300-pb do gene *msp1a* de *Anaplasma marginale*, em amostras de sangue de bezerros de fazendas da Paraíba.

Bezerro	Origem na Paraíba	Maior similaridade no Genbank (<i>Blast analysis</i>)			
		Numero de acesso	%	origem	cepa
1	Fazenda C	JN885133	99	Brasil	I15 (M. gouazoupira)
2	Fazenda C	JN885133	99	Brasil	I15 (M. gouazoupira)
7	Fazenda C	JN885133	99	Brasil	I15 (M. gouazoupira)
5	Fazenda D	FJ195757	98	Taiwan	TWN6
3	Fazenda E	FJ195757	98	Taiwan	TWN6
4	Fazenda E	AY846868	98	Israel	Israeli Lhavot-Habasan
5	Fazenda B	FJ195757	99	Taiwan	TWN6
6	Fazenda B	FJ195757	99	Taiwan	TWN6
7	Fazenda D	JN885132	99	Brasil	I19 (M. gouazoupira)
7	Fazenda E	JN885131	100	Brasil	I10 (M. gouazoupira)

Tabela 6. Comparação da sorologia para *Anaplasma marginale*, *Babesia. bigemina* e *Babesia bovis* com a PCR (padrão ouro) para cada agente.

Testes	Sorologia ^a		Sensibilidade % (IC 95%)	Especificidade % (IC 95%)	Concordância % (IC 95%)	Kappa (IC 95%)	P	
	+	-						
PCR	+	9	16	36	100	60,9	0,305	0,0002
<i>A. marginale</i>	-	0	16	(17,9 - 57,4)	(79,4 - 100)	(44,5 - 75,8)	(0,114 - 0,496)	
PCR	+	4	3	57,1	100	92,7	0,689	0,248
<i>B. bigemina</i>	-	0	34	(18,4 - 90,1)	(89,7 - 100)	(80,1 - 98,5)	(0,366 - 1,000)	
PCR	+	3	0	100	94,7	95,1	0,725	0,479
<i>B. bovis</i>	-	2	36	(29,2 - 100)	(82,3 - 99,4)	(83,5 - 99,4)	(0,367 - 1,000)	

^aEspecífica para cada agente.

Tabela 7. Comparação dos resultados de PCR para *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* com a sorologia de imunofluorescência indireta (padrão-ouro) para cada agente.

Testes	PCR ^a		Sensibilidade % (IC 95%)	Especificidade % (IC 95%)	Concordância % (IC 95%)	Kappa (IC 95%)	P
	+	-					
Sorologia <i>A. marginale</i>	+	9 0	100 (66,4 - 100)	50 (31,9 - 68,1)	60,9 (44,5 - 75,8)	0,305 (0,114 - 0,496)	0,0002
	-	16 16					
Sorologia <i>B. bigemina</i>	+	4 0	100 (39,8 - 100)	91,9 (78,1 - 98,3)	92,7 (80,1 - 98,5)	0,689 (0,366 - 1,000)	0,248
	-	3 34					
Sorologia <i>B. bovis</i>	+	3 2	60 (14,7 - 94,7)	100 (90,3 - 100)	95,1 (83,5 - 99,4)	0,725 (0,367 - 1,000)	0,479
	-	0 36					

^a Específica para cada agente

Tabela 8. Comparação dos resultados de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em vacas testadas entre 2009 e 2010 (Costa et al. 2011) e nas vacas mães dos bezerros avaliados no presente estudo.

Fazendas	<i>A. marginale</i> *		<i>B. bigemina</i> *		<i>B. bovis</i> *	
	Vacas (Costa et al. 2011)	Vacas (presente estudo)	Vacas (Costa et al. 2011)	Vacas (presente estudo)	Vacas (Costa et al. 2011)	Vacas (presente estudo)
A	0/24 (0)	0/14 (0)	0/24 (0)	0/14 (0)	1/24 (4,2)	0/14 (0)
B	0/15 (0)	0/7 (0)	0/15 (0)	0/7 (0)	7/15 (46,7)	0/7 (0)
C	4/19 (21,1)	0/6 (0)	0/19 (0)	0/6 (0)	1/19 (5,3)	0/6 (0)
D	4/14 (28,6)	0/7 (0)	1/14 (7,1)	0/7 (0)	4/14 (28,6)	0/7 (0)
E	4/15 (26,7)	0/7 (0)	6/15 (40,0)	0/7 (0)	8/15 (53,3)	0/7 (0)

* resultados apresentados como: número de vacas soropositivas / número de vacas amostradas (% de vacas soropositivas).

Discussão

Segundo trabalhos pioneiros ainda na década de 1970, áreas de instabilidade enzoótica para TPB são aquelas em que a porcentagem de infecção em animais acima de 9 meses está entre 20 e 75%, sendo esses níveis detectados mediante testes sorológicos (MAHONEY; ROSS, 1972). No presente trabalho, pelo teste sorológico utilizado, nenhuma das cinco propriedades apresentou mais de 75% dos bezerros soropositivo para *A. marginale*, *B. bigemina* ou *B. bovis* durante o primeiro ano, indicando que nenhuma delas estaria em condições de estabilidade enzoótica. Esses resultados estão de acordo com um trabalho prévio realizado em 37 propriedades rurais do sertão da Paraíba, onde em média, apenas 15,0%, 9,5% e 26,9% das vacas estavam soropositivas pela RIFI para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*, respectivamente (COSTA et al. 2013). Desta forma, segundo os critérios sorológicos, as cinco propriedades rurais do presente estudo apresentavam condições de instabilidade enzoótica para TPB, ou não apresentavam circulação dos três agentes da TPB, como foi o caso da propriedade A, ou para *Babesia* spp., como foi o caso das propriedades B e C, onde de fato, não foi encontrado o vetor *R. microplus*. Esta condição de instabilidade enzoótica condiz também com um trabalho prévio em que relatou diversos surtos de TPB, especialmente por *A. marginale*, no rebanho adulto de propriedades rurais do sertão da Paraíba (COSTA et al. 2011).

Considerando os resultados de PCR, 83,3% a 100% dos bezerros foram positivos para *A. marginale* entre o primeiro e oitavo mês de vida, nas propriedades B, C, D e E (Tabela 1). Por ser um método de detecção direta do agente, esses resultados indicam que esses bezerros apresentavam infecção ativa pelo agente. Sem dúvida, a PCR se mostrou um método muito mais sensível que a RIFI para diagnóstico de infecção por *A. marginale*, como demonstrado nas Tabelas 6 e 7. O fato da maioria dos bezerros positivos por PCR terem se mantido soronegativos para *A. marginale* durante o estudo pode estar relacionado com a dinâmica de infecção e anticorpos, uma vez que esses últimos tendem a aparecer algum tempo após a primo-infecção, especialmente quando se busca anticorpos exclusivamente da classe IgG, como foi o caso do presente estudo.

Muito embora a maioria das propriedades apresentaram incidência nula para *Babesia* spp., duas propriedades mostraram incidência maior para *B. bigemina* do que para *B. bovis*. Um estudo realizado na Austrália mostrou que, em condições naturais, as frequências de infecção por *Babesia* spp. em larvas não alimentadas de *R. microplus*

eram muito baixas, sendo 0,04% para *B. bovis* e 0,23% para *B. bigemina* (0,23%). Essa maior porcentagem de infecção por *B. bigemina* garantiria uma maior taxa de inoculação nos animais, resultando numa maior incidência desta espécie, quando comparada com *B. bovis* (MAHONEY, MIRRE, 1971; MAHONEY; ROSS, 1972). Tais fatos explicariam a maior incidência por *B. bigemina* observada nos bezerros das propriedades D e E do presente estudo.

As cinco propriedades rurais tiveram todas suas vacas testadas sorologicamente através da RIFI num estudo realizado entre julho de 2009 e julho de 2010 (COSTA et al. 2013), cerca de um ano antes do presente estudo. Naquela ocasião, os valores de soroprevalências por propriedade variaram de 0 a 28,7% para *A. marginale*, de 4,2 a 43,7% para *B. bovis*, e de 0 a 40% para *B. bigemina* (Tabela 8), indicando ausência de estabilidade enzoótica para os agentes da TPB. No estudo de Costa et al. (2013), foi levantado que não havia histórico tanto de carrapatos como de casos de TPB nos bovinos da propriedade A, onde praticamente todas vacas foram soronegativas para os três agentes da TPB (Tabela 8). Esta situação se manteve durante o presente estudo, onde todos os bezerros se mantiveram negativos durante o primeiro ano de vida. Segundo Costa et al. (2013), nas propriedades B, C e D havia histórico recente de carrapatos nos bovinos, com casos de TPB nas fazendas B e C; nesta última houve um surto de TPB em 2009, quando morreram 11 vacas (COSTA et al. 2011). De fato, o presente estudo demonstrou que a infecção por *A. marginale* continuou ocorrendo nessas três propriedades, demonstrado pelas altas incidências durante o primeiro ano de vida dos bezerros; já a infecção por *Babesia* spp. praticamente não ocorreu nos bezerros dessas três propriedades, indicando que mesmo com histórico recente de vacas soropositivas e de carrapatos (COSTA et al. 2013) ou com presença de carrapatos na fazenda D (presente trabalho), possivelmente os níveis de infestações por carrapatos não foram grande o suficiente para garantir uma taxa mínima de inoculação de *Babesia* spp. nos bovinos, conforme demonstrado por Mahoney; Ross, (1972), em função das limitações climáticas da região. Os animais da propriedade E apresentaram carrapatos no presente estudo, porém segundo Costa et al. (2013), não havia registro de surtos de TPB nos últimos 3 anos. Como esta foi a propriedade que apresentou os maiores valores de incidência *A. marginale* (100%), *B. bigemina* (85,7%) e *B. bovis* (42,8%) nos bezerros, é possível que esteja mais próxima de uma situação de estabilidade enzoótica, onde os casos de TPB passam a ser isolados, e não em forma de surtos.

Os resultados encontrados neste trabalho confirmam dados de um estudo anterior onde se observou serem mais frequentes as infecções por *A. marginale* do que por *Babesia* spp. no semiárido paraibano (COSTA et al. 2013), fato que pode estar associado às formas de transmissão, uma vez que a anaplasmose pode ser transmitida por vetores mecânicos como tabanídeos, além da transmissão pelo *R. microplus* (HAWKINS et al. 1982; KESSLER, 2001). Neste estudo, foi comprovado que os maiores picos de tabanídeos coincidiram com os maiores picos de chuvas em duas regiões distintas, sertão e cariri. No trabalho de Costa et al. (2011), foi observado que os surtos de anaplasmose bovina concentraram-se no final do maior período chuvoso. Desta forma, diante da distribuição irregular do carrapato *R. microplus*, ausente em muitas propriedades rurais do semiárido, e da presença de tabanídeos nos períodos chuvosos de praticamente todas as propriedades (Costa et al. 2013), é possível que esses dípteros tenham uma importância muito maior para a transmissão de *A. marginale* nesta região do Brasil. Por fim, não se pode destacar a importância da transmissão iatrogênica, uma vez que Costa et al. (2013) encontrou associação estatisticamente significativa entre uso frequente de medicamentos injetáveis com maiores prevalências por *A. marginale* no semiárido paraibano.

As análises de sequenciamento de DNA de produtos amplificados por PCR mostraram que pelo menos três haplótipos distintos de *A. marginale* circulam entre os bovinos do semiárido paraibano. Esses resultados corroboram o conceito de heterogenicidade genética de cepas de *A. marginale* no mundo (DE LA FUENTE et al., 2007). É possível que esta viabilidade de haplótipos esteja relacionada com diferentes formas de transmissão (biológica via carrapato e mecânica via tabanídeos), uma vez que tem sido demonstrado tanto no Brasil como nos Estados Unidos que, enquanto algumas cepas de *A. marginale* são transmitidas por carrapatos, outras são biologicamente incompatíveis com esses ácaros, restando a via mecânica de transmissão horizontal (WICKWIRE et al. 1987, GONÇALVES RUIZ et al. 2005).

Apenas um genótipo de *B. bigemina* foi encontrado nas amostras sequenciadas de bovinos e de carrapatos de duas fazendas, indicando ser o mesmo haplótipo já descrito na Argentina. É possível que este genótipo esteja disseminado na América do Sul. As sequências de *B. bovis* foram representadas por dois haplótipos, um inicialmente descrito no Sudeste (estado de São Paulo) e outro no Nordeste (estado da Bahia) (RAMOS et al. 2012). Essa diversidade de haplótipos encontrada no presente estudo deve ser considerada em futuros estudos de controle da TPB no sertão da Paraíba por

meio de vacinas, uma vez a resposta imune protetora pode variar conforme a heterogenicidade da cepa de antígeno usada (RAMOS et al. 2012). Por fim, o presente trabalho demonstra que, mesmo avaliando apenas cinco propriedades rurais, a incidência dos agentes da TPB ocorreu de forma heterogenia na região, corroborando o status de área de instabilidade enzoótica previamente relatado para o semiárido paraibano (COSTA et al. 2011, 2013). Desta forma, a vacinação de bezerros no primeiro ano de vida parece ser a alternativa mais viável para evitar surtos de TPB nas propriedades da região, assim como é empregada em outras áreas de instabilidade enzoótica do sul da América do Sul, áreas marginais da distribuição geográfica de *R. microplus* (FARIAS, 2007; SACCO, 2002).

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Referências

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215:403-410.
- Bastos CV, Passos LM, Facury-Filho EJ, Rabelo em, De La Fuente J, Ribeiro MF. Protection in the absence of exclusion between two Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* in experimentally infected calves. *Vet. J.* 2010; 186: 374-378.
- Costa VMM, Ribeiro MFB, Duarte ALL, Manguiera JM, Pessoa AFA, Azevedo SS, Barros ATM, Riet-Correa F, Labruna MB. Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomosis in a Brazilian semiarid region. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2013; 22 (1): xxx-xxx.
- Costa VMM, Rodrigues AL, Medeiros JMA, Labruna MB, Simões SVD, Riet-Correa F. Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 2011; 31(3) : 239-243.
- De la Fuente J, Ruybal P, Mtshali MS, Naranjo V, Shuqing L, Mangold AJ, Rodri'guez S D, Jime'nez R, Vicente J, Moretta R, Torina A, Almaza'n C, Mbatl PM, Echaide Torioni S, Farber M, Rosario-Cruz R, Gortazar C, Kocan KM. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Vet. Microbiol.* 2007; 119: 382–390.

- Farias N.A. 2007. Tristeza parasitária, p.524-532. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equinos. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria, RS.
- Gonçalves Ruiz PM, Passos LM, Ribeiro MF. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. *Vet. Parasitol.* 2005;128(3-4):325-31.
- Hawkins JA, Love JN, Hidalgo RJ. Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: Tabanidae). *Am. J. Vet. Res.* 1982; 43: 732-734.
- James MA, Coronado A, Lopez W, *et al.* Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. *Trop. An. Health Prod.* 1985;17: 9-18.
- Kessler RH. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Bras.* 2001; 21: 177-179.
- Mackinnon A. A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Computers in Biology and Medicine* 2000; 30(3):127-134.
- Madruga CR, Honer MR, Andreotti R, Araújo FR, Santaré MV. (1993). Simulação e sorologia no mapeamento da instabilidade enzoótica da babesiose: Um estudo nas regiões do Boqueirão e Cariri, Estado da Paraíba. In: Sem. Bras. Parasitol. Vet., 8, 1983. Londrina. *Anais...* Londrina, p.1. Resumo.
- Magonigle RA, Newby TJ. Response of cattle upon exposure to *Anaplasma marginale* after elimination of chronic carrier infections. *Am. J. Vet. Res.* 1984; 45(4): 695-697.
- Mahoney DF, Ross DR. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Austr. Vet. J.*, Brunswick 1972; 48: 292-298.
- Mahoney DF, Mirre GB. Bovine babesiosis: estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Ann Trop Med Parasitol* 1971; 65: 309-317.
- Ramos CA, Araújo FR, Alves LC, de Souza II, Guedes DS Jr, Soares CO. Genetic conservation of potentially immunogenic proteins among Brazilian isolates of *Babesia bovis*. *Vet Parasitol.* 2012;187(3-4):548-52.
- Sacco AMS. Controle de surtos de tristeza parasitária bovina. Circular Técnica 26, Embrapa Pecuária Sul, Bagé. 2002; 4p.
- Souza, FAL. *Babesiose e anaplasmosose em rebanhos bovinos leiteiros do Estado do Piauí, Brasil.* [Dissertação]. Teresina: Universidade Federal do Piauí; 2011.

- Trindade HI, Silva GRA, Teixeira MC, Sousa MG, Machado RZ, Freitas FLC, Almeida KS. Detection of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in calves from the region of Araguaína, State of Tocantins, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol.* 2010; 19(3): 169-173.
- IICA. *Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina*, San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para a Agricultura; 1987.
- Wickwire KB, Kocan KM, Barron SJ, Ewing SA, Smith RD, Hair JA. Infectivity of three *Anaplasma marginale* isolates for *Dermacentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.* 1987;48(1):96-9.
- Wright IG. Immunodiagnosis and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp and *Anaplasma* sp in domestic animals. *Rev. Scien. Technol. Off. Internat. Epizoot.* 1990; 9(2)345-356.

CONCLUSÕES

No sertão da Paraíba os surtos de TPB ocorrem no final da época de chuvas nas áreas de planaltos e serras, em áreas úmidas como as bacias do Rio do Peixe e Rioiranhas e também em áreas irrigadas, em que há a formação de microclimas favoráveis à sobrevivência do carrapato.

As áreas de instabilidade enzoótica são observadas nas regiões mais altas do sertão e nas bacias dos rios perenes, e áreas livres, nas regiões mais secas e quentes do sertão, podendo está se tornar estável, já que mesmo em áreas livres os carrapatos podem sobreviver durante anos chuvosos ou se manter em áreas de maior umidade em beiras de açudes e pastagens irrigadas.

A maior frequência da doença ocorre em adultos e se deve às condições climáticas do Sertão Paraibano que não permite a presença constante do carrapato e com isso, não há transmissão contínua dos agentes da TPB aos bovinos, principalmente em animais jovens, fazendo com que estes não desenvolvam imunidade específica adequada e tornem-se adultos sensíveis.

No Estado da Paraíba a maioria dos casos diagnosticados de tristeza parasitária bovina é causada pelo agente *Anaplasma marginale*, fato que pode estar associado às formas de transmissão, uma vez que a anaplasmose pode ser transmitida por vetores mecânicos como tabanídeos, além da transmissão pelo *R. microplus*.

A infecção por *Babesia* spp. não ocorre possivelmente devido os níveis de infestações por carrapatos não serem grande o suficiente para garantir uma taxa mínima de inoculação de *Babesia* spp. nos bovinos em função das limitações climáticas da região.

A situação epidemiológica da tristeza parasitária na Paraíba indica áreas de instabilidade enzoótica para *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*. No entanto, existem também áreas livres e áreas de estabilidade onde a proporção de bovinos com anticorpos é menor do que 20%.

Em áreas onde o carrapato não consegue sobreviver de um ano para o outro o ideal seria erradicar o vetor ou mantê-lo em quantidades muito baixas para que não ocorra transmissão.

A adoção da vacinação anual de bezerros pode ser uma boa prática para evitar surtos de babesiose ou anaplasmose em fazendas com instabilidade enzoótica do Estado da

Paraíba, assim como, tem sido adotado no sul do Brasil, onde a instabilidade enzoótica também prevalece.

ANEXOS

ANEXO 1: NORMA Nº 01/2011 da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande.

ANEXO 2: Instruções para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

ANEXO 3: Questionário Epidemiológico

ANEXO 4: Instruções para publicação na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

ANEXO 5: Artigo “Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis and tripanosomiasis in a Brazilian semiarid region” a “Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária”.

ANEXO 6: Comprovante de “Aceite” do artigo “Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis and tripanosomiasis in a Brazilian semiarid region” a “Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária”.

ANEXO 7: Comprovante de submissão do artigo “Incidência da infecção por *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bovinos durante o primeiro ano de vida em fazendas do semiárido paraibano” a “Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária”.

ANEXO 1**NORMA Nº 01/2011**

Altera a NORMA Nº 01/09 de 04 de fevereiro de 2009 e acrescenta novos critérios para a elaboração e defesa da dissertação e tese do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da UFCG.

O Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, no uso de suas atribuições, de conformidade com a legislação em vigor, e nos termos da Resolução Nº 13/02 do CONSEPE e do seu Regulamento.

RESOLVE:

Art. 1º Decide modificar a redação do § 1º do art. 2º da norma 01/2009 e estabelece que o aluno deva apresentar, antes da defesa, o comprovante de submissão dos trabalhos da dissertação e tese às revistas Qualis A1, A2, B1 e B2 da CAPES.

§ 1º - O corpo da dissertação será constituído por capítulos, pelo menos dois, e poderão ser da seguinte forma:

I - uma revisão da literatura e um trabalho já enviado a uma revista científica Qualis citadas no Caput do artigo;

II - dois trabalhos enviados à revista Qualis citadas no Caput do artigo.

§ 2º - O corpo da tese poderá ser constituído por:

I - três trabalhos submetidos a revistas científicas Qualis citadas no Caput do artigo;

II - dois trabalhos submetidos a revistas científicas Qualis citadas no Caput do artigo e uma revisão da literatura.

§ 3º Os demais itens relacionados com a elaboração da dissertação deverão seguir as normas no Anexo.

Art. 2º A qualificação do doutorado deverá ser feita em um prazo de 30 (trinta) meses após o ingresso do doutorando no Programa.

Art. 3º A presente Norma entra em vigor a partir da data de sua publicação.

Patos, 03 de junho de 2011.

Prof. Dr. Franklin Riet Correa
Coordenador do PPGMV

NORMAS PARA ELABORAÇÃO DA DISSERTAÇÃO E TESE
O corpo da dissertação será constituído por capítulos, pelo menos dois: 1- Revisão da literatura e 2- um trabalho nas normas da revista científica Qualis A ou B da CAPES o qual será enviado, obedecendo ao prazo máximo de 30 dias após a defesa.
Ao invés da revisão de literatura, o aluno poderá apresentar outro artigo científico, na mesma linha de pesquisa. A dissertação constará, dessa forma, de dois artigos científicos, um título que abranja os dois artigos, uma introdução e conclusões relacionadas aos dois artigos.
O trabalho será redigido seguindo as normas da revista para a qual será enviado
A revisão da literatura, se não tiver sido enviada para outra revista, deve seguir as mesmas normas que o trabalho a ser enviado, deverá ser incluída versão em inglês e português.
Se a dissertação constar de mais de um trabalho original, estes deverão seguir as normas das respectivas revistas para as quais serão enviados.
Em todos os casos, no final da dissertação devem ser incluídas, como anexo, as normas da (s) revista (s) para as quais os trabalhos serão enviados. Para a formação da dissertação, será utilizada a folha A4. O estilo da fonte deve ser Times New Roman, tamanho 12 e espaçamento 1,5 entre as linhas.
Na capa será incluído o nome da instituição, abaixo o título, ao lado direito à descrição da dissertação sem constar à área, abaixo o nome do mestrando e por último o nome da cidade, Estado e data.
A contracapa será constituída da mesma forma da capa, acrescentando-lhe apenas o nome do orientador e no verso, a ficha catalográfica.
No caso do aluno optar pela apresentação deverá ser incluída uma introdução com uma explicação dos dois trabalhos.
No final, após o último capítulo deverão ir as conclusões do (s) trabalho (s). Tanto na apresentação quanto nos diferentes capítulos e conclusões, nos exemplares para a defesa da dissertação deve ser incluído, à direita da folha, a numeração das linhas, exceto na versão final. O sumário será antes da introdução.
As Figuras, Tabelas ou Quadros devem ser incluídos dentro dos resultados, em folhas separadas, com não mais de 4 Figuras, Quadros ou Tabelas por folha.
Um volume deverá ser entregue à coordenação 45 dias antes da defesa para ser

encaminhado a um revisor para avaliação se o mesmo está apto à defesa.
Cinco exemplares da dissertação devem ser entregues à coordenação, no mínimo 30 dias antes da defesa.
Após a defesa o mestrando deverá entregar na coordenação do programa 5 (cinco) exemplares da dissertação, com pelo menos 2 (duas) em capa dura, no prazo previsto no regimento (30 dias após a defesa). Obrigatoriamente deverá constar a ficha catalográfica.
Na versão final da dissertação não deve constar o anexo da cópia do trabalho em inglês a ser publicado na revista, mas somente a cópia do trabalho em português. No anexo deverá constar uma folha mencionando o site da revista em que o artigo será publicado. Deverá ser entregue na Coordenação em separado uma cópia do artigo escrito em inglês, com as devidas correções da banca, a ser enviado para publicação.
Agradecimentos e dedicatórias serão optativos.
Entregar uma cópia em CD da dissertação e/ou tese em pdf em um único arquivo.
Deverá ser idêntico à versão impressa. Não será aceito a dissertação em mais de um arquivo.

Patos, 03 de junho de 2011.

Prof. Dr. Franklin Riet Correa
Coordenador do PPGMV

ANEXO 2



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão

recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto

significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando,

sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens**

(superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso)**;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”,

mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”**; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista **uma só vez**. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e **sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica**. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse **caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura

pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam

compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda

ANEXO 3**QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PARA PROPRIEDADE**

Número da propriedade: _____ Data: _____

DADOS GERAIS

Nome da propriedade: _____	
Tamanho da propriedade: _____	
Município: _____	
Fone: _____	Veterinário: _____
GPS: _____ Sul _____	Oeste _____ Altitude _____

REBANHO BOVINO

Numero total de bovinos: _____	Número de Vacas: _____
Vacas amostradas _____	Raça predominante: _____
Principal atividade: () Leite () Corte () Mista	

PASTAGEM

Tipo de pastagem: () Nativa () Cultivada ¹ () Mista ¹		
¹ Nome da pastagem cultivada _____		
Irrigação de pastagem: () Sim () Não		
Pastejo em vazante na seca: () Sim () Não		

CARRAPATOS NOS BOVINOS

Presença de carrapatos?	
() Nunca.	
() Somente uma época do ano. Quando? _____	
() Ano todo. Quando a infestação é maior? _____	
Faz controle? () Sim () Não	
Tipo de tratamento: () Banho () Pour-on () Injetável	
Nº de banhos carrapaticidas por ano? _____	
Intervalos entre os banhos: _____	
Meses do ano onde se concentram os banhos?	
J F M A M J J A S O N D	
Tipo de banho: () Bomba Costal () Bomba Motorizada () Outro _____	
Nº de vacas banhadas com uma bomba de 20 L: _____	

MUTUCAS

Presença de mutucas?	
() Nunca.	
() Somente uma época do ano. Quando? _____	
() Ano todo. Quando a infestação é maior? _____	

MURIÇOCAS/PERNILONGOS

Presença de muriçocas? <input type="checkbox"/> Nunca. <input type="checkbox"/> Somente uma época do ano. Quando? _____ <input type="checkbox"/> Ano todo. Quando a infestação é maior? _____
--

MOSCA-DOS-CHIFRES

Presença de mosca-dos-chifres? <input type="checkbox"/> Nunca. <input type="checkbox"/> Somente uma época do ano. Quando? _____ <input type="checkbox"/> Ano todo. Quando a infestação é maior? _____ Faz controle? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Tipo de tratamento: <input type="checkbox"/> Banho <input type="checkbox"/> Pour-on <input type="checkbox"/> Injetável N° de tratamentos por ano? _____ Intervalos entre os tratamentos: _____ Meses do ano onde se concentram os tratamentos? J F M A M J J A S O N D Tipo de banho: <input type="checkbox"/> Bomba Costal <input type="checkbox"/> Bomba Motorizada <input type="checkbox"/> Outro _____ N° de vacas banhadas com uma bomba de 20 L: _____

VERMÍFUGOS

Vermífuga: <input type="checkbox"/> todo rebanho <input type="checkbox"/> só bezerros Tipo de vermífugo: <input type="checkbox"/> oral <input type="checkbox"/> injetável ² <input type="checkbox"/> ambos ² N° de tratamentos por ano: _____ ² Meses do ano onde se concentram os tratamentos injetáveis: J F M A M J J A S O N D

VACINAÇÕES NOS ÚLTIMOS 24 MESES

	2008	2009
AFTOSA:	J F M A M J A S O N D	J F M A M J A S O N D
RAIVA:	J F M A M J A S O N D	J F M A M J A S O N D
OUTRAS:	J F M A M J A S O N D	J F M A M J A S O N D

OUTRAS INJEÇÕES COLETIVAS NOS ÚLTIMOS 24 MESES

	2008	2009
_____	J F M A M J A S O N D	J F M A M J A S O N D
_____	J F M A M J A S O N D	J F M A M J A S O N D
_____	J F M A M J A S O N D	J F M A M J A S O N D

AGULHAS

<input type="checkbox"/> a mesma a agulha para todos os animais <input type="checkbox"/> uma agulha por animal

INTRODUÇÃO DE ANIMAIS (as ultimas)

	Aquisição	Aquisição	Aquisição	Aquisição
Data da aquisição	_____	_____	_____	_____
N° de animais	_____	_____	_____	_____
Procedência	_____	_____	_____	_____
Veio com carrapato?	_____	_____	_____	_____

HISTÓRICO DE TRISTEZA PARASITÁRIA – MAL TRISTE

Houve casos/surtos nos últimos 2 anos? () sim ³ () não
³ Descrição dos últimos surtos: _____
Época do surto _____
Nº de animais acometidos? _____

Categoria animal _____
Com que tratou? _____
Nº de mortos: _____
Tipo Diagnóstico _____

ANEXO 4**Instruções aos Autores**

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Brazilian Journal of Veterinary Parasitology

Apresentação

A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária é um órgão oficial de divulgação do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária (CBPV). Tem como objetivo publicar temas relativos a Helmintos, Protozoários, Artrópodes e Rickettsias bem como assuntos correlatos. A revista tem periodicidade trimestral. São aceitas submissões de manuscritos, em inglês, de pesquisadores de qualquer país, associados ou não ao CBPV. Este periódico oferece a todos os pesquisadores acesso eletrônico livre para consulta de todos os trabalhos, desde seu primeiro volume publicado em 1992.

Política Editorial

Os artigos submetidos à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária deverão caracterizar-se como científicos e originais, essencialmente sobre parasitas de animais em geral.

O(s) autor(es) deverá(ão) anexar uma carta, previamente assinada, responsabilizando-se pela originalidade do artigo, salvo resumo(s) apresentado(s) em eventos científicos, não submetidos à publicação em outros periódicos. Trabalhos com mais de uma autoria deverão seguir com uma declaração de concordância de todos os autores, referente à publicação. Trabalhos com número excessivo de autores deverão ser avaliados pelos editores científicos assistentes, em relação ao protocolo experimental. É necessária a colaboração substancial de todos os autores no planejamento do estudo, obtenção, análise e interpretação de resultados, confecção do artigo e aprovação da versão final submetida e aceita. Colaboradores que não tiveram participação ativa em todo o processo descrito acima poderão ser listados na seção de agradecimentos. Poderá haver agradecimento ao pesquisador que forneceu auxílio técnico, correção ou

sugestão na escrita, ou ao chefe de departamento que proporcionou infraestrutura para elaboração do trabalho. O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator *ad-hoc*. Nesse processo, o editor-chefe e os editores científicos assistentes poderão sugerir ou solicitar as modificações necessárias, apesar de ser de responsabilidade dos autores os conceitos emitidos. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo, 3 revisores anônimos, selecionados pelo editor-chefe e editores científicos assistentes. A Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária atribui a seus artigos as categorias de: Artigos Completos, Notas de Pesquisa e Artigos de Revisão, sendo este último escrito por especialistas e condicionado a solicitação por convite do editor-chefe. Revisões não solicitadas não serão aceitas, mas o tópico da revisão pode ser sugerido, previamente, ao editor-chefe ou editores científicos assistentes.

Taxa de tramitação:

Da submissão do artigo, será cobrada uma taxa de R\$ 40,00 (quarenta reais) referente ao processo de tramitação, paga através de depósito bancário: Banco do Brasil/ Agência:

0269-0/ Conta Corrente: 28.848-9 (RBPV).

Processo de avaliação pelos pares

O processo de avaliação do trabalho dependerá da observância das Normas Editoriais, dos Pareceres do Corpo Editorial e/ou do Relator *ad-hoc*. Os artigos submetidos serão avaliados por, no mínimo, 3 revisores anônimos, selecionados pelo editor-chefe e editores científicos assistentes.

O relator deverá preencher o formulário de avaliação da RBPV, disponível no sistema on-line de submissão (<http://submission.scielo.br/index.php/rbpv>). Tendo recebido a avaliação de pelo menos 2 dos revisores selecionados, o(s) autor(es) receberá os formulários de avaliação e possíveis correções feitas diretamente no texto. O avaliador poderá corrigir novamente o artigo, se necessário.

Com a aprovação dos relatores, o artigo passa por revisão do inglês, pelos revisores credenciados pela RBPV. Após diagramação e editoração, os editores científicos assistentes e a editora-chefe da revista, fazem as correções finais.

Transferência de direitos autorais:

Ao ser submetido, o artigo deve vir acompanhado de um ofício, assinado

por todos os autores, concordando com a submissão e, caso aprovado, a publicação do artigo apenas na RBPV.

Ética

Experimentos que utilizam animais deverão ser conduzidos obedecendo às normas aprovadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (<http://www.cobea.org.br>), devendo os autores apresentarem o número de protocolo de submissão e aprovação dos trabalhos em Comissão de Ética e Bem-Estar Animal.

Apresentação dos Manuscritos

Na elaboração do texto serão observadas as seguintes normas:

Os trabalhos devem ser submetidos em inglês, de forma concisa, com linguagem impessoal e com os sinais de chamadas de rodapé em números arábicos, lançados ao pé da página em que estiver o respectivo número e em ordem crescente. Os trabalhos deverão ser apresentados em fonte “Times New Roman”, tamanho 12, com margem superior e inferior de 2,5 cm, esquerda e direita com 3 cm e espaçamento entre linhas de 1,5 cm com as páginas numeradas. Para a categoria Artigo Completo, o trabalho não deverá exceder 15 páginas, quando da diagramação final. Para a categoria Notas de Pesquisa, o trabalho não deverá exceder 5 páginas, quando da

diagramação final. As tabelas e ilustrações deverão ser apresentadas separadas do texto e anexadas ao final do trabalho, sem legendas. As respectivas legendas deverão vir no texto logo após as referências bibliográficas. Ao submeter o artigo, anexar o comprovante de depósito, via endereço eletrônico: <http://www.scielo.br/rbpv>. Os trabalhos aceitos deverão ser revisados por um dos revisores de língua inglesa credenciados pela RBPV, de escolha e sob responsabilidade dos autores. Os Artigos Completos devem ser organizados obedecendo à seguinte sequência: **Título Original, Título Traduzido, Autor(es), Filiação Institucional, Abstract (Keywords), Resumo (Palavras-chave), Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinação destes três últimos), **Agradecimentos** (facultativo) e **Referências Bibliográficas**.

As Notas de Pesquisa obedecem à sequência acima sem a necessidade de se destacar os tópicos, sendo escritas em texto corrido. Para essa categoria, o artigo submetido deve possuir alto grau de ineditismo e originalidade, trazendo resultados novos de importância evidente.

Características dos elementos de um trabalho científico

Título Original

O título “cheio” e o subtítulo (se houver) não devem exceder 15 palavras. Não deverá aparecer nenhuma abreviatura, e os nomes de espécies ou palavras em latim deverão vir em itálico. Evitar (por exemplo) títulos que iniciem com: Estudos preliminares; Observações sobre. Não usar o nome do autor e data de citação em nomes científicos.

Autor(es)/Filiação

Na identificação, deve constar: nome completo e por extenso de todos os autores (sem abreviação). A Filiação Institucional deve informar os nomes próprios de todas as instituições e não suas traduções: Laboratório, Departamento, Faculdade ou Escola, Instituto, Universidade, Cidade, Estado e País, exatamente nessa ordem. No rodapé, deve constar as informações do autor para correspondência: Endereço completo, telefone e e-mail atualizado, nessa ordem.

Referências Bibliográficas

As referências bibliográficas só serão admitidas desde que sejam de fácil consulta aos leitores. Não serão aceitas referências de trabalhos publicados em anais de congressos e as teses devem estar disponíveis para

consulta em sites oficiais, por exemplo, Banco de Teses da Capes: <http://www.capes.gov.br/servicos/banco-de-teses>. Todas as citações no texto devem ser cuidadosamente checadas em relação aos nomes dos autores e datas, exatamente como aparecem nas referências.

“Abstract” e Resumo

Devem conter no máximo 200 palavras, em um só parágrafo sem deslocamento. Não devem conter citações bibliográficas. Siglas e abreviações de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso, por exemplo, Indirect Fluorescence Assay (IFA). Devem ser informativos, apresentando o objetivo do trabalho, metodologia sucinta, os resultados mais relevantes e a conclusão. O abstract redigido em língua inglesa e o resumo em língua portuguesa, ambos seguidos por keywords e palavras chave, respectivamente.

Keywords e Palavras-chave

As palavras-chave devem expressar com precisão o conteúdo do trabalho. São limitadas em no máximo 6 (seis).

Introdução

Explicação clara e objetiva do estudo, da qual devem constar a relevância e objetivos do trabalho, restringindo as citações ao necessário.

Material e Métodos

Descrição concisa, sem omitir o essencial para a compreensão e reprodução do trabalho. Métodos e técnicas já estabelecidos devem ser apenas citados e referenciados. Métodos estatísticos devem ser explicados ao final dessa seção.

Resultados

O conteúdo deve ser informativo e não interpretativo: sempre que necessário devem ser acompanhados de tabelas, figuras ou outras ilustrações autoexplicativas.

Discussão

Deve ser limitada aos resultados obtidos no trabalho e o conteúdo deve ser interpretativo. Poderá ser apresentada como um elemento do texto ou juntamente aos resultados e conclusão. Enfatizar a importância de novos achados e novas hipóteses identificadas claramente com os resultados.

Tabelas

Elaboradas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e no final; e devem ser enviadas em formato editável (desejável excel). A legenda (título) é precedida da palavra

Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismos arábicos, devendo ser descritivas, concisas e inseridas acima das mesmas. As tabelas devem estar limitadas a um número mínimo necessário. Devem ser digitadas em espaço duplo em arquivos separados.

Figuras

As figuras, tais como: desenho, fotografia, prancha, gráfico, Quoxograma e esquema, devem ser enviadas em formato tif, gif ou jpg, com no mínimo de 300 dpi de resolução e numeradas consecutivamente. As legendas devem ser precedidas da palavra Figura, seguida da numeração em algarismo arábico e inseridas abaixo das mesmas. Listar as legendas numeradas com os respectivos símbolos e convenções, em folha separada em espaço duplo. O número de ilustrações deve ser restrito ao mínimo necessário. Fotografias digitais deverão ser enviadas em arquivos separados, como foram obtidas. Se a escala for dada às figuras, utilizar a escala BAR em todas as ilustrações ao invés de numérica, que pode ser alterada com a redução das figuras.

Conclusões

As conclusões podem estar inseridas na discussão ou em resultados e discussão, conforme a escolha dos

autores. Nesse caso, esse item não será necessário.

Agradecimentos

Quando necessário, limitados ao indispensável.

Referências Bibliográficas

A lista de referências deverá ser apresentada em ordem alfabética e, posteriormente, ordenadas em ordem cronológica, se necessário. Mais de uma referência do(s) mesmo(s) autor(es) no mesmo ano deve ser identificada pelas letras “a”, “b”, “c”, etc, inseridas após o ano de publicação. Títulos de periódicos devem ser abreviados conforme Index Medicus - <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopis/ma/medicus.php?lang=eng>.

Livros

Levine JD. *Veterinary protozoology*. Ames: ISU Press; 1985.

Capítulo de livro

Menzies PI. Abortion in sheep: diagnosis and control. In: Youngquist RS, [relfall WR. *Current therapy in large animal theriogenology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 667-680.

Artigo de periódico

Paim F, Souza AP, Bellato V, Sartor AA. Selective control of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in &pronil-

treated cattle raised on natural pastures in Lages, State of Santa Catarina, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(1): 13-16.

Tese e Dissertação

Araujo MM. *Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de patos, Paraíba - Brasil* [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2002.

Documento eletrônico

Centers for Disease Control and Prevention. *Epi Info* [online]. 2002 [cited 2003 Jan 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>.

Obs. Nas referências, apresentar os nomes dos seis primeiros autores; para referências com mais de seis autores, apresentar os seis primeiros nomes seguidos da expressão et al.

Citações

As citações devem seguir o sistema autor-data:

Um autor: nome do autor e ano de publicação

Levine (1985) ou (LEVINE, 1985)

Dois autores: os nomes dos autores e ano da publicação

Paim e Souza (2011) ou (PAIM; SOUZA, 2011)

Três ou mais autores: nome do primeiro autor seguido de “et al.” e o ano de publicação

Araújo et al. (2002) ou (ARAÚJO et al., 2002)

Prova Gráfica

O trabalho diagramado em formato pdf. será enviado por e-mail ao autor correspondente. Alterações no artigo, quando aceitas para publicação, devem ser realizadas nesse estágio, com permissão do editor-chefe. Portanto, o trabalho deve ser cuidadosamente corrigido antes de responder ao editor, pois inclusões de correções subsequentes (indicação de novo autor, mudança de parágrafos inteiros ou tabelas) não podem ser garantidas.

ANEXO 5**Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomosis in a Brazilian semiarid region**

Soroprevalência e fatores de risco para anaplasmoze, babesiose e tripanosomíase bovina em uma região semiárida do Brasil

Valéria M. M. Costa¹; Múcio Flávio B. Ribeiro²; Amélia Lizziane L. Duarte¹; Julia M. Mangueira¹; André Flávio A. Pessoa¹; Sergio S. Azevedo¹; Antonio Thadeu M. Barros³; Franklin Riet-Correa¹; Marcelo B. Labruna^{4*}

¹ Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, Brazil

² Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

³ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Corumbá, MS, Brazil.

⁴ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brazil

* **Corresponding author:** Marcelo Bahia Labruna. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brazil. e-mail: labruna@usp.br

Abstract

The seroprevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, and *Trypanosoma vivax* and the risk factors for these infections were investigated in 509 cows from 37 farms in the semiarid region of Paraíba, northeastern Brazil. Cow sera were tested by immunofluorescence assay (IFA) against each specific antigen. Mean seroprevalence values per farm were 15.0% (range: 0-75%) for *A. marginale*, 9.5% (range: 0-40%) for *B. bigemina*, and 26.9% (range: 0-73.7%) for *B. bovis*. All cows tested negative for *T. vivax*. Higher prevalence for *A. marginale* was significantly associated with a less frequent acaricide spraying per year, and with higher use of injectable antihelminthics. The presence of positive cows for *B. bigemina* was significantly associated with the use of acaricide, and with the presence of horse flies in the farm. Both the occurrence and the higher prevalence of *B. bovis* were significantly associated with the recent observations of ticks on cattle. Overall, the present results indicate that the region investigated represents an enzootic instable area for *A. marginale*, *B. bigemina*, and *B. bovis* since most animals were seronegative to at least one agent.

Keywords: *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, cattle, risk factors, Brazil

Resumo

A soroprevalência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Trypanosoma vivax*, assim como os fatores de risco para estas infecções, foram investigadas em 37 fazendas (total de 509 vacas) da região semiárida da Paraíba, nordeste do Brasil. A presença de anticorpos nos soros dos animais foi detectada pela técnica de imunofluorescência indireta, utilizando antígenos específicos. Os valores médios de soroprevalência por fazenda foram 15,0% (0-75%) para *A. marginale*, 9,5% (0-40%) para *B. bigemina*, e 26,9% (0-73,7%) para *B. bovis*. Todas as vacas foram soronegativas para *T. vivax*. As maiores prevalências de *A. marginale* foram significativamente associadas com menor uso de carrapaticidas por ano e com uso mais frequente de antihelmínticos injetáveis. A soroprevalência de *B. bigemina* foi significativamente associada com o uso de carrapaticidas, e com a presença de mutucas na fazenda. Tanto a ocorrência como a maior soroprevalência para *B. bovis* nas fazendas

foram significativamente associadas com a presença recente de carrapatos nos bovinos. No geral, os resultados indicam que as fazendas amostradas estão situadas em área de instabilidade enzoótica para *A. marginale*, *B. bigemina*, e *B. bovis*, uma vez que a maioria dos animais foi soronegativa para pelo menos um dos agentes.

Palavras-chave: *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, bovino, fatores de risco, Brasil

Introduction

With over 200 million cattle, Brazil has the largest commercial bovine herd of the world, mostly exposed to the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Most of the time, *R. microplus* is the sole tick species infesting cattle in Brazil (ARAGÃO, 1936; CAMPOS PEREIRA et al., 2008). This tick species is a primary vector of the bacterium *Anaplasma marginale*, and the protozoa *Babesia bigemina* and *Babesia bovis*, which may contribute for the generally high prevalence of such tick-borne agents throughout the country. However, the occurrence of diseases caused by these agents is generally dependent on the climatic conditions of each region. In most of the country, cattle babesiosis and anaplasmosis occur endemically because environmental conditions provide moderate to high *R. microplus* burdens infesting pastured cattle throughout the year. In this case, cattle are generally infected by *A. marginale*, *B. bigemina*, and *B. bovis* during the first weeks or months after birth, then remain infected (seropositive) without suffering severe disease for the rest of their life (RIBEIRO; REIS, 1981; MADRUGA et al., 1984; 1985; PATARROYO et al., 1987; SANTOS et al., 2001). On the other hand, environmental conditions are not suitable for *R. microplus* all over the year in some areas, such as in southern Brazil (and Uruguay), where mean temperature below 15°C inhibit tick development during autumn-winter months. Consequently, many animals do not get in contact with infected ticks during their first months, and when they are later primo-infected, severe disease with high lethality is a common feature (NARI; SOLARI, 1991; MARTINS et al., 1994; GUGLIELMONE, 1995; MARANA et al., 2009).

The African agent of surra, *Trypanosoma vivax*, first reported in South America in the early 20th century, is considered to be mechanically transmitted by biting flies, such as tabanids and *Stomoxys calcitrans* (HOARE, 1972). These flies are also incriminated as mechanical vectors of *A. marginale* (HAWKINS et al., 1982;

KESSLER, 2001). In Brazil, *T. vivax* has been sporadically reported infecting ruminants, as recently reported in three outbreaks affecting cattle in the semiarid region of the State of Paraíba (BATISTA et al., 2007; 2008).

The state of Paraíba, located in the northeastern region of Brazil, is characterized by warm weather throughout the year. The state is geographically subdivided into the following four major regions, based mostly on vegetation type and rainfall: (i) Zona da Mata (Atlantic forest), (ii) Agreste, (iii) Cariri, and (iv) Sertão (Fig. 1). The Zona da Mata and Agreste have relatively higher rainfall regimes (CABRERA; WILLINK, 1973). Both Cariri and Sertão (the semiarid region) are typically within the Caatinga biome, which encompasses an area of 900,000 km² (11% of the Brazilian territory) and is the only major biome that occurs exclusively in Brazil. Caatinga is xeric shrubland and thorn forest, which consists primarily of small, thorny trees that shed their leaves seasonally. Cacti, thick-stemmed plants, thorny brush, and arid-adapted grasses make up the ground layer; however, during the dry periods there is no ground foliage or undergrowth (ANDRADE-LIMA, 1981). The weather is characterized by a hot and semiarid climate, the temperature averaging 27°C and the mean annual rainfall is typically ≈500 mm. There are typically two seasons, a rainy season from February to May, and a long drought period from June to January; however, the occurrence of droughts sometimes longer than 1 year is also a characteristic of the region (BATISTA et al., 2007). Indeed, this usual long drought period has important implications, yet to be evaluated under natural conditions, for the vectors of *A. marginale* and *Babesia* spp. to cattle raised in the Caatinga biome.

During the last decades, dairy cattle have become significantly important for the Paraíba animal husbandry. Except for the Zona da Mata region (where sugarcane crops prevail), cattle raising small farms are widespread in the Agreste, Cariri, and Sertão regions. Whereas cultivated grasses (mostly *Brachiaria* spp.) are the basis for Agreste livestock, cattle are usually reared extensively on native Caatinga in most of the Cariri and Sertão farms. Until very recently, cattle babesiosis or anaplasmosis had remained unreported in the Caatinga biome of the state of Paraíba. A recent study by our group described 24 outbreaks of cattle anaplasmosis and/or babesiosis in cattle farms of the Sertão region of that state (COSTA et al., 2011). These outbreaks affected mostly cows, with 36% mean lethality rate (range: 0-100%), indicating that many of the affected cows were not immune, i.e., they had not been previously infected by *Anaplasma* or *Babesia* agents. Herein, we investigated for the first time the seroprevalence of cattle to *A.*

marginale, *B. bigemina*, *B. bovis*, and *T. vivax* in farms from the semiarid region of Paraíba, as well as the risk factors for these agents.

Materials and Methods

From July 2009 to July 2010, blood samples were collected from cattle in 37 small farms in the state of Paraíba, being 25 farms in the Sertão, 9 in the Cariri, and 3 in the Agreste regions (Fig. 1). A total of 509 blood samples were obtained. In each farm 5 to 30 cows were sampled. Only small farms with herd size varying from 8 to 180 cattle were investigated. During farm visits, a standard questionnaire was applied to the farm owner or manager in order to obtain information for the risk factors study. The independent variables studied are shown in Table 1.

Each cow serum was tested by immunofluorescence assay (IFA) against antigens of *A. marginale* strain UFMG1, *B. bigemina* strain BbigMG, *B. bovis* strain BbovMG, and *T. vivax* strain IgarapeMG, as previously described (BASTOS et al., 2010; CUGLOVICI et al., 2010). For the first three agents, antigens consisted of parasitized erythrocytes obtained from splenectomized calves that had been experimentally inoculated (HICA, 1987). Antigens of *T. vivax* consisted of fixed trypomastigotes, obtained from an experimentally-infected splenectomized goat (CUGLOVICI et al., 2010). Sera were considered positive if they displayed specific reaction to one of the four antigens, at the 1:80 serum dilution. In each reaction, we used appropriate negative and positive control sera from experimentally- or naturally-infected cattle with each of the agents (COSTA-JÚNIOR et al., 2006; BASTOS et al., 2010; CUGLOVICI et al., 2010).

The proportions of serologically positive cows for *A. marginale*, *B. bigemina*, or *B. bovis* were calculated separately for each farm. For data analysis, a logistic regression was performed to construct multivariate models that could explain the dependent variables (cows serologically positive for *A. marginale*, *B. bigemina*, or *B. bovis*) as a function of the 24 independent variables at a dichotomous level (absence = 0; presence = 1) (Table 1). The serological results of each farm were analyzed at two separate dichotomous levels: firstly, with the presence or absence of serologically positive cows (no positive cow = 0; at least one positive cow in the farm = 1), and secondly, at the proportion of positive cows in the farm (less than 25% of cows positive = 0; more than 25% of cows positive = 1). The independent variables were subjected to univariate analysis and those with statistical association (here considered as $P < 0.20$, chi-square

test, for this first analysis) were tested in the multivariate model by the stepwise forward method. The variables were included in the multivariate model if they displayed statistical significance of $P < 0.05$, considering also the significance level of the final model. All analyses were performed using SPSS for Windows (1999).

Results

Among the 509 sampled cows, 211 (41.5%) were seropositive to at least one agent. Simple infection was observed in 170 (33.4%) cows, being 53 positive solely for *A. marginale*, 33 solely for *B. bigemina*, and 84 solely for *B. bovis*; dual infection was observed in 34 (6.7%) cows, being 24 for both *A. marginale* and *B. bovis*, and 10 for both *B. bigemina* and *B. bovis*; triple infection, namely, seropositivity for *A. marginale*, *B. bigemina*, and *B. bovis*, was detected in only 7 (1.4%) cows. All cows were seronegative for *T. vivax*. Overall seroprevalence values according to geographic regions are shown in Table 2. The number of cows sampled per farm ranged from 5 to 30 (mean: 13.8 ± 6.2). Mean seroprevalence values per farm were $15.0 \pm 18.1\%$ (range: 0-75%) for *A. marginale*, $9.5 \pm 12.5\%$ (range: 0-40%) for *B. bigemina*, and $26.9 \pm 24.1\%$ (range: 0-73.7%) for *B. bovis*. Among the 37 sampled farms, 14 (37.8%), 18 (48.6%), and 7 (18.9%) had all their cows negative for *A. marginale*, *B. bigemina*, and *B. bovis*, respectively. A total of 10 (27.0%), 4 (10.8%), and 17 (45.9%) farms showed seropositivity prevalence above 25% for *A. marginale*, *B. bigemina*, and *B. bovis*, respectively.

By the univariate analysis, the presence of at least one serologically positive cow for *A. marginale* was statistically coupled ($P < 0.20$) with variables No. 3, 9, 18, 20, and 23 (Table 1). However, when these independent variables were subjected to the multivariate analysis, none was significant. By the univariate analysis, the presence of more than 25% of serologically positive cows for *A. marginale* was statistically coupled ($P < 0.20$) with variables No. 2, 3, 4, 12, 13, 19, and 20. When these independent variables were subjected to the multivariate analysis, only the use of less than four acaricide sprayings per year (No. 13), and more than 2 applications of injectable antihelminthics per year (No. 19) were significantly associated ($P < 0.05$) (Table 3).

By the univariate analysis, the presence of at least one serologically positive cow for *B. bigemina* was statistically coupled ($P < 0.20$) with variables No. 12, 14, 18, and 23. When these independent variables were subjected to the multivariate analysis, only the use of spraying for acaricide application (No. 12), and the presence of horse flies in

the farm (No. 14) were significantly associated ($P<0.05$) (Table 3). By the univariate analysis, no independent variable was associated at the $P< 0.20$ significance level with a prevalence higher than 25% for *B. bigemina*

By the univariate analysis, the presence of at least one serologically positive cow for *B. bovis* was statistically coupled ($P< 0.20$) with variables No. 6, 8, 9, 11, 12, and 13. When these independent variables were subjected to the multivariate analysis, only the recent observations of ticks on cattle (No. 9) was significantly associated ($P<0.05$) (Table 3). By the univariate analysis, the presence of more than 25% of serologically positive cows for *B. bovis* was statistically coupled ($P< 0.20$) with variables No. 4, 9, 11, and 13. When these independent variables were subjected to the multivariate analysis, only the recent observations of ticks on cattle (No. 9) was significantly associated ($P<0.05$) (Table 3).

Discussion

Based upon the classical epidemiological conceptual model, the risk of babesiosis and anaplasmosis outbreaks can be indirectly measured by determining the proportion of cattle of a known age having anti-*Babesia* spp. and anti-*A. marginale* antibodies (MAHONEY; ROSS, 1972; ALONSO et al., 1992; GUGLIELMONE et al., 1997). In this case, primary exposure to infected vectors is desired to occur in calves up to 7-9 months old, when they are naturally resistant to clinical effects, and develop immunity lasting for at least 2 years. Cattle herds under this condition are considered to be under enzootic stability for babesiosis or anaplasmosis (MAHONEY; ROSS, 1972). On the other hand, in farms where primary exposure to infected vectors do not occur in calves under 9 months old, cattle herds are considered to be under enzootic instability for babesiosis or anaplasmosis because older, seronegative cattle become highly susceptible to clinical effects of babesiosis or anaplasmosis, and consequently, the farm is at risk of outbreaks of these diseases (MAHONEY; ROSS, 1972).

Overall, our results indicate that the farms sampled in the present study may be under enzootic instability for *A. marginale*, *B. bigemina*, or *B. bovis* since most animals were seronegative to at least one agent. This condition is corroborated by recent outbreaks of anaplasmosis and babesiosis reported in 24 farms in the Sertão region of Paraíba (COSTA et al., 2011). These outbreaks, which occurred from 2007 to 2009, were associated with atypically higher rainfall favoring higher vector abundance and, consequently, higher exposure of susceptible animals to infected vectors, both ticks (in

the case of *Babesia* spp. and *A. marginale*), and biting flies (in the case of *A. marginale*) (COSTA et al., 2011).

Cattle seroprevalence values were 2 to 3 times higher for *B. bovis* than for *B. bigemina*, although both agents were generally found in low percentages in the study region, with most of the cows being seronegative. Mahoney and Ross (1972) reported that if tick populations are suppressed either by natural or artificial conditions, cattle might not be exposed to *Babesia*-infected ticks because their numbers under natural conditions are extremely low. This should explain the overall low seroprevalence values found in the present study, in which only 14 farms (37.8%) reported tick infestations all year long (Table 1). In addition, since the primary *B. bovis* infection tends to last for a much longer period than the primary *B. bigemina* infection (MAHONEY; ROSS, 1972), higher seroprevalence for *B. bovis* should be expected in marginal areas like the semiarid region of Paraíba, where cattle exposure to *Babesia* spp.-infected ticks might not be frequent; therefore, *B. bigemina* primo-infected animals may become seronegative before being reinfested by *B. bigemina*-infected ticks.

Three outbreaks of cattle trypanosomiasis due to *T. vivax* were recently reported in distinct farms in the Sertão region of Paraíba between 2002 and 2006 (BATISTA et al., 2007; 2008). While the origin of the first outbreak in 2002 remains unknown, the subsequent two outbreaks (2005 and 2006) were associated to cattle movement among these farms (BATISTA et al., 2008). Those outbreaks occurred in the north of Paraíba state, approximately 70 km from the nearest farms sampled in the present study, which were located in the counties of Sousa and São José do Espinharas. We found no serologic evidence of *T. vivax* infection in cattle, which led us to conclude that this parasite is not widespread in the state, where it might have encountered ecological barriers for spreading, such as the absence of vectors during the typically long drought period.

Higher farm seroprevalence values (>25%) for *A. marginale* were significantly associated with a less frequent (<4) acaricide spraying per year, a condition that could be related to higher cattle exposure to ticks, but also to higher exposure to biting flies, since most commercial acaricides are synthetic pyrethroids, which are potent fly repellents (MENCKE, 2006). Bloodsucking flies may play an important role in mechanical transmission of *A. marginale* in the region. Besides the fact that experimental transmission of *A. marginale* by tabanids has been successfully demonstrated, it was also observed that horse flies may remain mechanically infective

for at least 2 hours after a blood meal on an infected animal (HAWKINS et al., 1982). Indeed, some authors consider mechanical transmission of *A. marginale* by biting flies even more important than biological transmission by ticks under certain conditions, especially because of the lack of transovarial transmission of *A. marginale* in *R. microplus* ticks (UILENBERG, 1970; RIBEIRO; LIMA, 1996), as well as the inability of some strains of *A. marginale* to infect ticks, including *R. microplus* (GONÇALVES RUIZ et al., 2005). Higher seroprevalences of *A. marginale* were also associated with several (>2) applications of injectable antihelminthics per year; this observation might be related to iatrogenic transmission of *A. marginale*, which has been reported to be an important transmission route of this agent among cattle in Brazil (KESSLER, 2001).

The presence of at least one serologically positive cow for *B. bigemina* in the farm was significantly associated with the use of spraying for acaricide application. While this association may seem unexpected at first glance, one might infer that the farms treating cattle should have higher tick infestations. In Brazil, the vast majority of farmers use manual backpack sprayers for applying acaricides on cattle, which usually result in incorrect application under field conditions, and consequently, inefficient tick control (AMARAL et al., 2011). In the present study, all farmers that reported to spray cattle also reported to use backpack sprayers (data not shown); therefore, inefficient application and poor tick control does not suppress the chances of cattle being exposed to *B. bigemina*-infected ticks. The presence of *B. bigemina*-infected cows was also associated with the presence of horse flies in the farm. Since *Boophilus* ticks are the only known vectors in Brazil of *B. bigemina* (GUGLIELMONE, 1995), we could infer that the noticeable presence of tabanids in the farms may be related to suitable environmental conditions not just for the horse flies but also for ticks, since humid lowlands that would provide breeding sites for tabanids, also may favor pastures with a suitable vegetable coverage for tick reproduction. Finally, both the occurrence and the higher seroprevalence of *B. bovis* in the farms were significantly associated with the recent observations of ticks on cattle, which is an expected association because *Boophilus* ticks are the only known vectors in Brazil of *B. bovis* (GUGLIELMONE, 1995)

In conclusion, the present study shows that in a region of the state of Paraíba, where a semiarid and hot climate prevails, bovine babesiosis and anaplasmosis occur under enzootic instability ($\leq 75\%$ seroprevalence). Although our survey sampling (37 cattle farms), which were randomly selected according to logistic reasons, does not

statistically represent the whole diversity of situations in the state, results obtained from the 37 farms were very consistent regarding the serological results; i.e., with a few exceptions, most animals in the farms were seronegative to *B. bigemina*, *B. bovis*, and *A. marginale*. The characteristic weather (long drought period) and vegetation type (Caatinga) of the region seems to be related to this enzootic instability, similarly to the conditions reported for the semiarid Chaco biome in northern Argentina (GUGLIELMONE et al., 1997). Thus, the adoption of yearly vaccination of calves may be a proper practice to prevent babesiosis or anaplasmosis outbreaks in the farms within the Caatinga biome of the state of Paraíba, just like it has been adopted in southern Brazil, where enzootic instability also prevails, but due to another reason, the extreme low autumn-winter temperatures.

Acknowledgments

We thank Alberto L. Rodrigues for his technical support during field work. This work was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Alonso M, Arellano-Sota C, Cereser VH, Cordoves CO, Guglielmono AA, Kessler R, Mangold AJ, Nari A, Patarroyo JH, Solari MA, Vega CA, Viscaíno O, Camus E. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. *Rev sci tech Off Int Epiz* 1992; 11: 713-733.
- Amaral MAZ, Rocha CMBM, Faccini JL, Furlong J, Monteiro CMO, Prata MCA. Perceptions and attitudes among milk producers in Minas Gerais regarding cattle tick biology and control. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20: 194-201.
- Andrade-Lima D. The Caatinga dominium. *Rev bras Bot* 1981; 4: 149-153.
- Aragão H. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1936; 31: 759-843.
- Bastos CV, Passos LM, Facury-Filho EJ, Rabelo EM, de la Fuente J, Ribeiro MF. Protection in the absence of exclusion between two Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* in experimentally infected calves. *Vet J* 2010; 186: 374-378.
- Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MMG, Madruga CR, Simões SDV, Maia TF. Trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid:

- description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Vet Parasitol* 2007; 143: 174–181.
- Batista JS, Bezerra FSB, Lira RA, Carvalho JRG, Rosado Neto AM, Petri AA, Teixeira MMG. Clinical, epidemiological and pathological signs of natural infection in cattle by *Trypanosoma vivax* in Paraíba, Brazil. *Pesq Vet Bras* 2008; 28: 63–69.
- Cabrera AL, Willink A. *Biogeografia de America Latina*. Washington, D.C.: Organización de los Estados Americanos; 1973.
- Campos Pereira M, Labruna MB, Szabo MPJ, Klafke GM. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus - Biologia, Controle e Resistência*. São Paulo: MedVet Livros; 2008.
- Costa VMM, Rodrigues AL, Medeiros JMA, Labruna MB, Simões SVD, Riet-Correa F. Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. *Pesq Vet Brás* 2011; 31: 239-243.
- Costa-Júnior LM, Rabelo EM, Martins Filho OA, Ribeiro MF. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. *Vet Parasitol* 2006;139: 231-236.
- Cuglovici DA, Bartholomeu DC, Reis-Cunha JL, Carvalho AU, Ribeiro MF. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. *Vet Parasitol* 2010; 169: 320-326.
- Gonçalves Ruiz PM, Passos LM, Ribeiro MF. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. *Vet Parasitol* 2005; 128: 325-331.
- Guglielmone AA. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol* 1995; 57: 109-119.
- Guglielmone AA, Echaide ST, Pérez y Santaella M, Iglesias JA, Vanzini VR, Lugaresi CI, Dellepiane EL. Cross-sectional estimation of *Babesia bovis* antibody prevalence in an area of Argentina used for extensive cattle breeding as an aid to control babesiosis. *Prev Vet Med* 1997; 30: 151-154.
- Hawkins JA, Love JN, Hidalgo RJ. Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: Tabanidae). *Am J Vet Res* 1982; 43: 732-734.
- Hoare CA. *The trypanosomes of mammals: a zoological monograph*. Oxford: Blackwell; 1972.
- IICA. *Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina*, San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para a Agricultura; 1987.
- Kessler RH. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesq Vet Bras* 2001; 21: 177-179.

- Madruga CR, Aycardi E, Kessler RH, Schenk MAM, Figueiredo GR, Curvo JBE. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, em bezerros em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesq Agropec bras* 1984; 19: 1163-1168.
- Madruga CR, Kesler RH, Gomes A, Schenk MAM, Andrade DF. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesq Agropec bras* 1985; 20: 135-142.
- Mahoney DF, Ross DR. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust Vet J* 1972; 48: 292-298.
- Marana ERM, Dias JA, Freire RL, Vicentini JC, Vidotto MC, 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. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009; 18: 20-26.
- Martins JR, Correa BL, Ceresér VH, Arteché CCP, Guglielmone AA. Some aspects of the epidemiology of *Babesia bovis* in Santana do Livramento, southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 1994; 3: 75-78.
- Mencke N. Acaricidal and repellent properties of permethrin, its role in reducing transmission of vector-borne pathogens. *Parassitologia* 2006; 48: 139-140.
- Nari A, Solari MA. Epidemiología y control del *Boophilus microplus* en Uruguay. Su relación con *Babesia* spp. *Rvta Cub Cienc Vet* 1991; 22: 149-160.
- Patarroyo JHS, Ribeiro MFB, Santos JL, Faria JE. Epidemiologia das babesioses bovinas no Estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos fluorescentes na Zona da Mata, MG. *Arq Bras Med Vet Zoot* 1987; 39: 423-429.
- Ribeiro MFB, Reis R. Prevalência da anaplasmosse em quatro regiões do Estado de Minas Gerais. *Arq Esc Vet UFMG* 1981; 33: 57-62.
- Ribeiro MF, Lima JD. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 1996; 61: 31-39.
- Santos HQ, Linhares GFC, Madruga CR. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos de leite da microregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e Elisa. *Ciência Animal Brasileira* 2001; 2: 133-137.
- SPSS for Windows. *SPSS Base 9.0.1. Users guide*. Chicago: SPSS Inc.; 1999.

Uilenberg G. Notes sur les babésioses et l'anaplasmose des bovins à Madagascar. IV.
Note additionnelle sur la transmission. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* 1970; 23: 309-312.

ANEXO 6

Marcelo Bahia Labruna,

Aguardamos o envio do artigo "Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis, and trypanosomosis in a Brazilian semiarid region" com correção da língua inglesa, pois o mesmo será publicado no número 2, portanto encaminhá-lo o mais breve possível.

Att.,

Rosangela Zacarias Machado

zacariascbpv@fcav.unesp.br

—

Brazilian Journal of Veterinary Parasitology

<http://submission.scielo.br/index.php/rbpv>