



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**  
**EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA**  
**AGROPECUÁRIA - EMBRAPA**  
**MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À**  
**AGROPECUÁRIA**



**TÁSSIA ALANA ALVES FERREIRA**

**Diagnóstico molecular e taxas de infecção de *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* em rebanhos bovídeos e artrópodes parasitas na Amazônia**

**BELÉM/PA**

**2019**

**TÁSSIA ALANA ALVES FERREIRA**

**Diagnóstico molecular e taxas de infecção de *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* em rebanhos bovídeos e artrópodes parasitas na Amazônia**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, da Universidade Federal Rural da Amazônia como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Luciana Gatto Brito

**BELÉM/PA**

**2019**

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Luciana Gatto Brito - Presidente (Orientador)  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

Dr. Ednaldo da Silva Filho - Membro Interno  
Universidade Federal Rural da Amazônia

---

Dr. Igor Guerreiro Hamoy - Membro Interno  
Universidade Federal Rural da Amazônia

---

Dr. Alexandre do Rosário Casseb - Suplente  
Universidade Federal Rural da Amazônia

---

Dr. Fábio da Silva Barbieri - Membro Externo  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que me abençoou com saúde. Com ela, tudo é possível com esforço e dedicação.

Ao meu anjo da guarda que sempre esteve ao meu lado me protegendo dos perigos do mundo.

Aos meus falecidos pais, Maria e Marco, que sempre farão parte das conquistas na minha vida, pois suas vidas foram doadas para criar e educar cinco crianças.

A minha orientadora, Luciana Gatto Brito, que me recebeu de braços abertos e mudou completamente, e para melhor, a minha vida profissional. Não há palavras que possam expressar minha admiração, gratidão e carinho.

A minha ex-orientadora, Naiara Zoccal, que me aceitou, inicialmente, como sua orientanda. Apesar de não conseguir me orientar em todo mestrado, passou minha orientação para a minha orientadora Luciana.

Aos meus irmãos, Aline, Thiago e Wagner, que sempre torceram e acreditaram em mim. O sentimento é recíproco.

Ao Danilo, meu namorado, confidente, amigo e companheiro. Que sempre acreditou em mim e que segurou a minha mão nos momentos de dificuldade e felicidade. Sempre sendo mais que um namorado.

A psicóloga e amiga, Ana Paula Penaforte, que me ajudou a superar o medo e a ansiedade causados pelos obstáculos da vida.

Aos técnicos da Embrapa Oriental, Leonária, Pedro e Francisco, que enriqueceram meus conhecimentos em Biologia Molecular.

Aos amigos de Laboratório, Daniellen e Thiago, pelo excelente trabalho em equipe.

A equipe de campo, chefiada pelo Dr. Fábio Barbieri, que realizaram as coletas de sangue, carrapatos e dípteros hematófagos.

Aos professores da Pós em Biotecnologia, Ednaldo, Reginaldo e Luciana, que compartilharam seus conhecimentos em Genética, Bioquímica, Biologia Molecular e Redação Científica.

Ao Laboratório de Genética Aplicada, da Universidade Federal Rural da Amazônia, formado por pessoas educadas e gentis como o André Sá e o Sávio Guerreiro.

Aos amigos e amigas, Sayuri, Tayná, Cárta, Larissa, Aline, Tânia, Matheus, Alana, Wilk, Taiza, Luan, Ananda, que sempre me apoiaram, acreditaram e torceram por mim.

As amigas especiais, Karina e Luana, que evoluíram de companheiras de trabalho na graduação, para grandes amigas, tornando a vida mais doce com uma amizade sincera.

A Família Brasil, em especial a minha vizinha Mariazinha, que sempre se lembra de mim em suas orações, pedindo a Deus e a nossa Senhora que olhem por mim.

A Família Alves, que mesmo distante, sempre reza e manda energias positivas. Sempre torcendo por mim e meus irmãos.

A Família Costa, que me adotou como filha, preenchendo em alguns momentos, o vazio deixado pela partida de meus pais.

A Marílio Salgado, coordenador do Idiomas sem Fronteiras, e ao Dr. Igor Guerreiro, coordenador da Pós, que se empenharam em resolver a problemática da proficiência em Inglês.

A Universidade Federal Rural da Amazônia e ao Dr. Reginaldo Buselli por terem criado o programa de Pós-Graduação em Biotecnologia que mudou os rumos da minha formação profissional.

À CAPES, órgão financiador da minha bolsa.

À Embrapa, órgão financiador do projeto de pesquisa.

Ao povo brasileiro, que através do pagamento de seus impostos, financiou a minha bolsa de estudos.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida de <i>Babesia</i> spp. em hospedeiro vertebrado e invertebrado.....	11
<b>Figura 2:</b> Esquema do ciclo de desenvolvimento de <i>A. marginale</i> em bovinos e carrapatos. ....	14
<b>Figura 3:</b> Nested PCR. Após a amplificação utilizando primers externos (PCR), uma segunda amplificação (nPCR) é feita com primers internos que conferem maior especificidade, minimizando falsos positivos que possam ter sido amplificados na PCR. ....	18
<b>Figura 4:</b> Vaca bovina e seu bezerro utilizados no estudo.....	19
<b>Figura 5:</b> Teleóginas de <i>R. microplus</i> . A) Teleóginas antes da postura de ovos. B) Teleóginas após a postura de ovos.....	21
<b>Figura 6:</b> Extração de DNA de dípteras hematófagos. ....	22
<b>Figura 7:</b> Eletroforese dos produtos de amplificação do DNA de <i>A. marginale</i> por PCR. Amostras positivas com bandas de 458 pares de bases. Poço 1 a 10 = PCRs positivas; Poço 11 = PCR negativa; Poço 12 = controle positivo; Poço 13 = marcador de peso molecular (100 pares de bases). ....	26
<b>Figura 8:</b> Eletroforese dos produtos de amplificação do DNA de <i>B. bovis</i> por nPCR. Amostras positivas com bandas de 290 pares de bases. Poço 1 = PCR negativa; Poço 2 a 9 = PCRs positivas; Poço 10 = controle positivo; Poço 11 = marcador de peso molecular (100 pares de bases). ....	26
<b>Tabela 1:</b> Sequências iniciadoras (primers) internas e externas para amplificação de DNA de <i>A. marginale</i> e <i>B. bovis</i> . ....	23
<b>Tabela 2:</b> Comparação estatística entre as taxas de infecção encontradas para <i>B. bovis</i> e <i>A. marginale</i> em larvas de carrapatos coletados em rebanho bovino. ....	30
<b>Tabela 3:</b> Comparação estatística entre as taxas de infecção encontradas para <i>B. bovis</i> e <i>A. marginale</i> em <i>H. irritans</i> coletadas em rebanho bovino e <i>S. calcitrans</i> coletadas em rebanho bubalino. ....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**µl:** Microlitro

**CEUA:** Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Amazônia Oriental

**Concea:** Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

**DNA:** Ácido desoxirribonucleotídeo

**dNTPBs:** Desoxirribonucleotídeos fosfatados

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético

**IC:** Intervalo de Confiança

**ICMBio:** Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

**KCL:** Cloreto de potássio

**ml:** Mililitro

**nPCR:** Nested PCR

**OR:** *Odds ratio*

**pb:** Pares de bases

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**SISBIO:** Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

**TE:** Tampão de eluição

**TPB:** Tristeza Parasitária

**VG:** Volume globular

## RESUMO

Anaplasmosose e Babesiose são doenças endêmicas em rebanhos bovinos e bubalinos em regiões tropicais e subtropicais do mundo, as quais, na maioria das vezes, não são diferenciadas e, popularmente, denominadas como Tristeza Parasitária Bovina (TPB). Na América do Sul ambas patologias estão estritamente relacionadas à ocorrência do carrapato-dos-bovinos, *Rhipicephalus microplus*, principal vetor de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. Em ambas hemoparasitoses, a participação da transmissão vertical dos agentes patogênicos é considerada sem importância epidemiológica, tanto em bovinos quanto em bubalinos. Buscou-se estabelecer a participação epidemiológica da transmissão transplacentária de *A. marginale* e *B. bovis*, assim como a participação dos artrópodes parasitas na epidemiologia da Babesiose e da Anaplasmosose em rebanhos bovídeos estabelecidos na Amazônia através da pesquisa molecular. A reação em cadeia da polimerase (PCR) e a nested PCR (nPCR) foram utilizadas, respectivamente, para o diagnóstico específico de *A. marginale* e *B. bovis* a partir de amostras de DNA provenientes de bovinos, bubalinos e artrópodes parasitos colhidos nos rebanhos. Os resultados revelaram que todas as vacas bovinas estavam infectadas por *A. marginale* no momento do parto e a taxa de infecção congênita observada foi de 81,25% (13/16). A taxa de infecção por *B. bovis* nas vacas bovinas foi de 93,75% (15/16) e a taxa de infecção congênita observada foi de 81,25% (15/16). Em bubalinos, a taxa de infecção por *A. marginale* nas vacas no momento do parto foi de 61,54% (8/13) com uma taxa de infecção congênita de 23,08% (3/13). A taxa de infecção por *B. bovis* nas vacas foi de 53,84% (7/13) com uma taxa de infecção congênita de 30,77% (4/13). Todos os animais eram portadores assintomáticos dos agentes causadores da TPB. A taxa de infecção encontrada nas larvas de carrapatos foi 44,4% (200/450) para *A. marginale* e 55,9% (247/450) para *B. bovis*. A taxa de infecção em dípteros hematófagos, espécimes adultos de mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*, coletados sobre bovinos apresentaram taxa de infecção de 11,4% (27/236) para *A. marginale* e de 9,3% (22/236) para *B. bovis*, enquanto que na mosca-dos-estábulo, *Stomoxys calcitrans*, coletadas sobre bubalinos apresentaram uma taxa de infecção de 1,5% (1/65) para *A. marginale* e de 12,3% (8/65) para *B. bovis*. As taxas de transmissão transplacentária observadas demonstram que essa é uma importante via envolvida na epidemiologia da TPB em rebanhos bovinos e bubalinos, porém, vem sendo subestimada sua participação na epidemiologia da infecção tanto por *A. marginale* quanto *B. bovis* no Brasil. A participação de dípteros hematófagos na epidemiologia da TPB necessita de maiores esclarecimentos, principalmente no que se refere à viabilidade de infecção dos parasitas presentes no aparelho bucal destes dípteros para o hospedeiro vertebrado.

**Palavras-chave:** Dípteros hematófagos. Hemoparasitas. PCR. nPCR. Transmissão Transplacentária.

## ABSTRACT

Anaplasmosis and Babesiosis are endemic diseases in cattle and buffaloes in tropical and subtropical regions of the world, and those, in the most of the time they are not differentiated and is known as cattle tick fever (CTF). In South America, both pathologies are directly related to the occurrence of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, main vector of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. In both hemoparasites diseases, the participation of the vertical transmission of the pathogens is considered without epidemiological importance, both in cattle and in buffaloes. We sought to establish the epidemiological participation of the transplacental transmission of *A. marginale* and *B. bovis*, as well as a participation of arthropods parasites in the epidemiology of anaplasmosis and babesiosis in bovine and buffaloes herds in Amazonia through molecular approaches. The polymerase chain reaction (PCR) and the nested PCR (nPCR) were used, respectively, for the specific diagnosis of *A. marginale* and *B. bovis* from bovine, buffalo and arthropod DNA samples collected in herds. The results showed that all bovine cows were infected by *A. marginale* at birth and the congenital infection rate was 81.25% (13/16). The rate of *B. bovis* infection in bovine cows was 93.75% (15/16) and a congenital infection rate was 81.25% (15/16). In buffaloes, the infection rate of *A. marginale* in the cows in the moment of birth was 61.54% (8/13) with a congenital infection rate of 23.08% (3/13). The *B. bovis* rate infection in cows was 53.84% (7/13) with a congenital infection rate of 30.77% (4/13). All animals were asymptomatic carriers of the agents that caused BPS. The prevalence in tick larvae was 44.4% (200/450) for *A. marginale* and 55.9% (247/450) for *B. bovis*. In hematophagous dipterans, adults of horn fly, *Haematobia irritans*, collected in cattle have a prevalence of 11.4% (27/236) for *A. marginale* and 9.3% (22/366) for *B. bovis*, while in *Stomoxys calcitrans* flies collected on buffaloes showed an infection rate of 1.5% (1/65) for *A. marginale* and 12.3% (8/65) for *B. bovis*. The observed transplacental transmission rates demonstrate that this is an important epidemiological route in bovine and buffalo herds, but their participation in the epidemiology of *A. marginale* and *B. bovis* in Brazil has been underestimated. The participation of hematophagous dipterans in the epidemiology of CTF requires further clarification, especially with regard to the viability of infection of the parasites present in the oral apparatus of these dipterans for the vertebrate host.

**Key-words:** Hematophagous dipterans. Hemoparasites. PCR. nPCR. Transplacental transmission.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	iv
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	6
2. OBJETIVOS .....	8
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	9
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5. ANÁLISE DOS DADOS .....	24
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
7. CONCLUSÃO .....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente, 214.899.800 cabeças e, o maior rebanho bubalino da América do Sul, com 1.381.395 cabeças, sendo que no Estado do Pará possui o maior rebanho bubalino do país (IBGE, 2017). O setor pecuário é responsável por gerar milhares de postos de trabalho diretos e indiretos, desempenhando um importante papel econômico-social no país, tanto pelo quantitativo nacional, principalmente de bovinos, quanto pela contribuição da cadeia de valor de bovídeos ao Produto Interno Bruto (PIB) nacional. Dada à importância da pecuária nacional, justificase a realização de estudos epidemiológicos direcionados não só a resguardar os rebanhos bovinos nacionais da ocorrência de surtos que podem acarretar importantes perdas à economia nacional, mas também para evitar o uso indevido de fármacos que acabam por determinar a presença de contaminantes químicos nos produtos advindos de rebanhos tratados de forma desnecessária (BRITO et al., 2007).

A Babesiose e a Anaplasmosose são doenças endêmicas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (GUGLIELMONE, 1995). No Brasil, a ocorrência dessas duas patologias está associada à presença de seu principal vetor, o carrapato-dos-bovinos, *Rhipicephalus microplus*. As duas doenças causam uma condição infecciosa popularmente conhecida como Tristeza Parasitária Bovina (TPB) (SACCO, 2001).

No Brasil, a Babesiose é causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina*, enquanto que a Anaplasmosose tem como principal agente patogênico a rickettsia *Anaplasma marginale* (KOCAN et al., 2003; BOCK et al., 2004). O carrapato-dos-bovinos é considerado o principal vetor tanto da Babesiose quanto da Anaplasmosose, mas, na epidemiologia desta rickettsia, também há a possibilidade da transmissão mecânica por dípteras hematófagos e iatrogênica por fômites (AUBRY; GEALE, 2011; BATTILANI et al., 2017). A via transplacentária na transmissão de *A. marginale* e *B. bovis* não é considerada como de importância na epidemiologia de ambos as parasitoses, mas estudos de Silva et al. (2014) e Costa et al. (2016) indicam que esta via de infecção pode estar sendo subestimada na epidemiologia da TPB nos rebanhos bovídeos nacionais.

Os sintomas da TPB são variados, mas prevalecem: febre, hemoglobinúria, anemia, danos ao sistema nervoso e, na maioria dos casos quando não há tratamento, ocorre a morte

dos animais. A ocorrência de surtos de TPB comprometem a produtividade dos rebanhos acometidos, uma vez que, a elevação de índices de morbidade determinam prejuízos econômicos relacionados a queda na produção de leite, a perda de peso dos animais e aos altos custos com tratamentos, que aliados ao aumento nas taxas de mortalidade e de incidência de abortos, acabam por determinar a perda da eficiência produtiva destes rebanhos (SACCO, 2001; KOCAN et al., 2003; BOCK et al., 2004). De acordo com Grisi et al. (2014), no Brasil, as perdas econômicas determinadas pelos agentes causais da TPB, assim como as associadas aos seus vetores invertebrados como o carrapato-dos-bovinos (*R. microplus*), a mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) e a mosca-dos-estábulo (*Stomoxys calcitrans*) são estimadas em cerca de R\$ 24,64 bilhões anuais.

Tradicionalmente, o diagnóstico da Babesiose e da Anaplasmosose é realizado pelo exame direto de esfregaço de sangue periférico corado por Giemsa, no qual é possível identificar a presença dos parasitas através de microscopia de luz. Entretanto, esta técnica possui baixa sensibilidade, uma vez que somente permite o diagnóstico de animais sintomáticos, enquanto que os animais assintomáticos não são diagnosticados, sendo estes últimos os que mais contribuem para a manutenção da endemicidade da doença, pois atuam como reservatórios para a transmissão dos hemoparasitas (BULING et al., 2007; BRITO et al., 2010, 2013).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é sensível e específica, necessitando de mínimas quantidades de DNA para obtenção de cópias suficientes para que possam ser detectadas em uma matriz inerte (GARIBYAN; AVASHIA, 2013). A técnica de nested PCR (nPCR) é derivada da PCR, sendo mais sensível e específica, pois possibilita a amplificação do DNA alvo mesmo em baixa concentração. Técnicas moleculares como a PCR, tornaram-se ferramentas úteis ao diagnóstico de uma série de patologias que acometem tanto aos animais quanto ao homem e, vem sendo utilizadas de forma cada mais rotineira para o diagnóstico das hemoparasitoses que acometem os animais de produção, como os agentes causais da TPB (FIGUEROA et al., 1993; ISHMAEL; STELLATO, 2008).

Na epidemiologia da TPB estão envolvidos componentes bióticos e abióticos que relacionam-se a suscetibilidade genética dos rebanhos, idade, disponibilidade de vetores, clima e manejo sanitário dos animais. Tais fatores são determinantes para estabelecer a situação enzoótica dos rebanhos e para a avaliação de risco relacionada à introdução de

animais suscetíveis procedentes de áreas de instabilidade enzoótica ou áreas não endêmicas para os agentes causais da TPB. De acordo com Uilenberg (1992) a suscetibilidade do gado em contrair a doenças é um fator tão importante quanto à presença de vetores.

A pecuária na Amazônia avançou tecnologicamente nas últimas décadas. O melhoramento genético dos rebanhos bovinos e bubalinos resultou no aumento da produtividade e na competitividade dos produtos oriundos dessas cadeias de valor econômico. Os estudos epidemiológicos estão atrelados a esses avanços, uma vez que buscam evidenciar patologias que acometem os animais de produção e também resguardar, principalmente, bovinos geneticamente superiores, muito dos quais resultantes de cruzamentos industriais, da ocorrência de surtos de doenças. Tais estudos são fundamentais para o estabelecimento da situação enzoótica de importantes patologias dos animais de produção, a qual fundamentará a elaboração e o desenvolvimento de tecnologias de prevenção e controle destas enfermidades.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Detectar molecularmente os agentes patogênicos *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* responsáveis pela manutenção da endemicidade da Tristeza Parasitária Bovina em rebanhos bovídeos estabelecidos na Amazônia.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- (1) Determinar a taxa de infecção molecular por *A. marginale* e *B. bovis* em vacas gestantes bovinas e bubalinas criadas em áreas endêmicas para Tristeza Parasitária Bovina na Amazônia.
- (2) Determinar a taxa de bezerros bovinos e bubalinos recém-nascidos infectados via transplacentária por *A. marginale* e *B. bovis*.
- (3) Determinar a taxa de larvas de *R. microplus* infectadas por *A. marginale* e *B. bovis*.
- (4) Determinar a taxa de dípteros hematófagos infectados por *A. marginale* e *B. bovis*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Complexo Tristeza Parasitária

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é uma enfermidade que compreende duas patologias comuns em regiões tropicais e subtropicais do mundo, a Babesiose, causada pelos protozoários *B. bigemina*, e *B. bovis* e, a Anaplasmosse, causada pela rickettsia *A. marginale* (GUGLIELMONE, 1995; TRINDADE; ALMEIDA; FREITAS, 2011). Os rebanhos bovinos suscetíveis apresentam a infecção por estes hemoparasitas de forma sintomática, enquanto que, os bubalinos, mesmo que infectados não apresentam sinais clínicos da doença. O mecanismo de infecção de ambas as patologias envolve artrópodes parasitas de bovídeos que são responsáveis pela transmissão dos agentes infecciosos, o que justifica que o carrapato-dos-bovinos e os dípteros hematófagos sejam considerados como os importantes agentes limitantes ao desenvolvimento da pecuária nos países tropicais e subtropicais (DE VOS; JORGENSEN, 1992; BOCK et al., 2004).

Num mesmo eritrócito bovino ou bubalino pode-se observar a presença de merozoítos de *Babesia* spp. e de corpúsculos intra-eritrocitários de *Anaplasma* spp. O diagnóstico direto por microscopia de luz é possível uma vez que ambos os parasitas apresentam formas bem características que permitem sua fácil identificação. *Babesia* spp. apresentam forma piriforme quando no interior dos eritrócitos, sendo que, *B. bovis* pode ser reconhecida por ser pequena, pleomórfica e tipicamente se apresenta como pequenos corpos arredondados ou como corpos pareados em forma de pera, formando um ângulo obtuso no interior do eritrócito (TAYLOR et al., 2010), enquanto que, *Anaplasma* spp. pode ser observado como um “corpúsculo de inclusão”, que quando corado com Giemsa possui coloração violeta escuro, arredondado e pequeno, sendo *A. marginale* localizado na margem exterior da hemácia (JAIN, 1993).

#### 3.2 Babesiose

Em 1888, Viktor Babes, relatou a presença de microrganismos em células eritrocíticas de bovinos doentes e correlacionou com o surgimento de hemoglobinúria nesses animais (SCHNITTGER et al., 2012; BABES, 1888, 1892 *apud* (FLORIN-CHRISTENSEN et al., 2014). Em 1893, Theobald Smith e Frederick Kilborne observaram que o microrganismo identificado por Babes era um protozoário transmitido pelo carrapato *Rhipicephalus anulatus* (SMITH & KILBORNE, 1893 *apud* KOCAN et al., 2010; SCHNITTGER et al., 2012;

FLORIN-CHRISTENSEN et al., 2014). Essas observações de Smith e Kilborne foram a base para o estabelecimento de um programa de erradicação do *R. anulatus* no Estados Unidos da América, o que resultou na erradicação da Babesiose em 1943 (GRAHAM, 1977 *apud* MOSQUEDA et al., 2012).

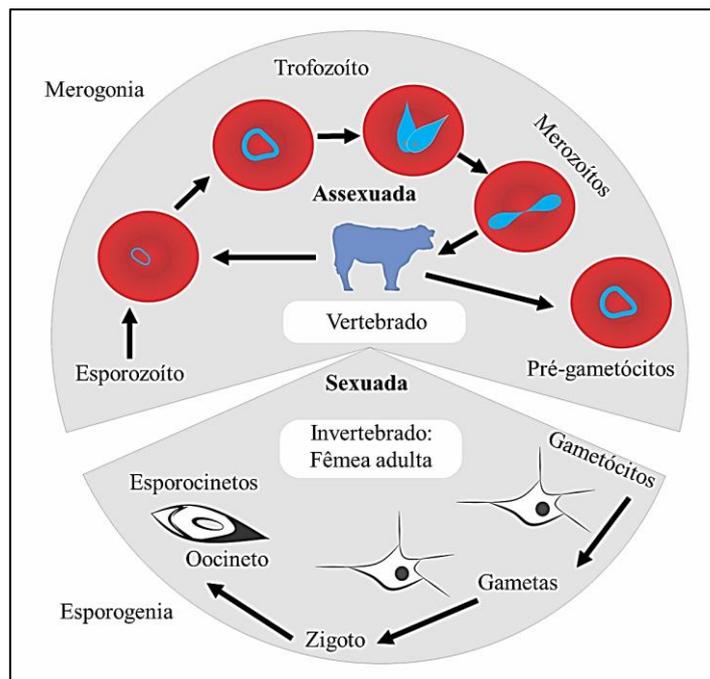
A Babesiose é causada por protozoários do gênero *Babesia*, família Babesiidae da ordem Eucoccidiorida. É uma doença muito comum que acomete animais domésticos e silvestres e também o homem (HOMER et al., 2000; BOCK et al., 2004). Entre as várias espécies de *Babesia*, destaca-se a *B. bovis* que têm grande impacto na criação de bovinos. A infecção por *B. bovis* é mais patogênica quando comparada a infecção causada por *B. bigemina*, uma vez que pode provocar altas taxas de mortalidade nos animais acometidos. *B. bovis* pode ser encontrada facilmente nos capilares de vísceras como baço, rins, fígado, coração, pulmão e cérebro (EVERITT et al., 1986; MASSARD, FREIRE, 1985; KESSLER et al., 1983; BROWN et al., 2006; CHAUVIN et al., 2009), sendo considerada um dos mais importantes hemoparasitas para a bovinocultura no mundo (TALKHAN; RADWAN; ALI, 2010; ZIAPOUR; ESFANDIARI; YOUSSEFI, 2011).

### **3.3 Ciclo Biológico da *Babesia* spp.**

No hospedeiro vertebrado, um esporozoíto penetra na membrana celular do eritrócito com a ajuda de uma estrutura apical especializada e, por demerogônia se diferencia em dois trofozoítos que se apresentam de forma anelar no interior da célula (MEHLHORN; SCHEIN, 1984; BOCK et al., 2004). Cada trofozoíto irá gerar por fissão binária dois merozoítos que inicialmente ficam unidos e possuem o formato de “peras”. Após um período de maturação, esses merozoítos se separam e saem do eritrócito, sem causar lise celular. Na corrente sanguínea, alguns merozoítos invadem novos eritrócitos para continuar seu ciclo de desenvolvimento se transformando em trofozoítas, enquanto que outros merozoítos continuam na corrente sanguínea até serem ingeridos por carrapatos e continuarem seu ciclo biológico no hospedeiro invertebrado. Quando os merozoítos chegam ao lúmen do intestino dos carrapatos, eles são estimulados a se diferenciarem em gametócitos que se diferenciam em gametas masculinos e femininos que se fusionarão, formando um zigoto. Esse zigoto (estágio de infecção) se desenvolve e penetra nas células intestinais do carrapato. Nessas células, o zigoto sofre fissão que origina os corpos cinéticos móveis que destroem as células intestinais e escapam para a hemolinfa e diferentes tecidos do carrapato (Figura 1), incluindo os ovários. No ovário, os corpos cinéticos infectam as células embrionárias, dando origem à transmissão

transovariana. Quando a fêmea põe seus ovos, eles já estarão infectados e ao se desenvolverem em larvas, que infestarão o hospedeiro vertebrado (bovino ou bubalino), se desencadeará a migração dos corpos cinéticos para as glândulas salivares do carrapato que se diferenciarão em esporoblastos que darão origem a milhares de esporozoítos. As larvas do carrapato se alimentam do sangue do hospedeiro e os esporozoítos são liberados através da saliva do carrapato na corrente sanguínea do animal (MOSQUEDA et al., 2012).

**Figura 1:** Ciclo de vida de *Babesia* spp. em hospedeiro vertebrado e invertebrado.



Fonte: Adaptado de Chauvin et al. (2009).

### 3.4 Anaplasmosose

O primeiro relato sobre o gênero *Anaplasma* foi feito por Sir Arnold Theiler, no ano de 1910. Ao corar o sangue de bovinos doentes e percebeu que haviam “pontos” no interior de alguns eritrócitos, os quais ele inicialmente identificou como protozoários. Erroneamente, Smith e Kilborne sugeriram que os “pontos” encontrados por Theiler eram formas biológicas de *B. bigemina*, contudo Theiler se opôs e definiu que a Anaplasmosose e a Babesiose eram doenças diferentes, mas que apresentavam algumas semelhanças e que poderiam coexistir no mesmo animal (KOCAN et al., 2010).

A Anaplasmosose bovina é causada por rickettsias do gênero *Anaplasma*, família Anaplasmataceae e ordem Rickettsiales (KOCAN et al., 2003). É uma doença que acomete os

rebanhos bovinos, mas pode ocorrer em outros ruminantes, como bubalinos (*Bubalus bubalis*). A sintomatologia clínica em casos agudos da doença se caracteriza por febre, perda de peso, diminuição na produção de leite, letargia, icterícia, aborto e, em muitos casos determinam a morte dos animais infectados (KOCAN et al., 2003; LIS et al., 2015).

A Anaplasmosose é uma doença infecciosa porém não é contagiosa, sendo transmitida biologicamente, e pelas vias mecânica, iatrogênica e também congênita. A transmissão biológica é causada por carrapatos, principalmente, do gênero *Rhipicephalus* (SUAREZ; NOH, 2011). A transmissão iatrogênica se dá através da utilização de instrumental cirúrgico contaminado com sangue infectado, tais bisturis e agulhas (KOCAN et al., 2010). A transmissão mecânica se dá por dípteros hematófagos, que carregam o parasita de um animal infectado a outro quando realizam o repasto sanguíneo (BATTILANI et al., 2017), enquanto que, a transmissão transplacentária ocorre quando vacas gestantes infectadas transmitem os patógenos aos seus bezerros ainda na fase intrauterina (POTGIETER; VAN RENSBURG, 1987; LIS et al., 2015). Na América do Sul, a Anaplasmosose é endêmica nas áreas que possuem condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do carrapato *R. microplus*, principal vetor de *Anaplasma* spp. nas Américas (GUGLIELMONE, 1995).

#### 3.4.1 Classificação dos dípteros hematófagos da família Muscidae

A classificação taxonômica para as moscas hematófagas *H. irritans* e *S. calcitrans* é a seguinte:

**Reino:** Animalia

**Filo:** Arthropoda

**Classe:** Insecta

**Ordem:** Diptera

**Família:** Muscidae

**Gênero:** *Haematobia*, *Stomoxys*

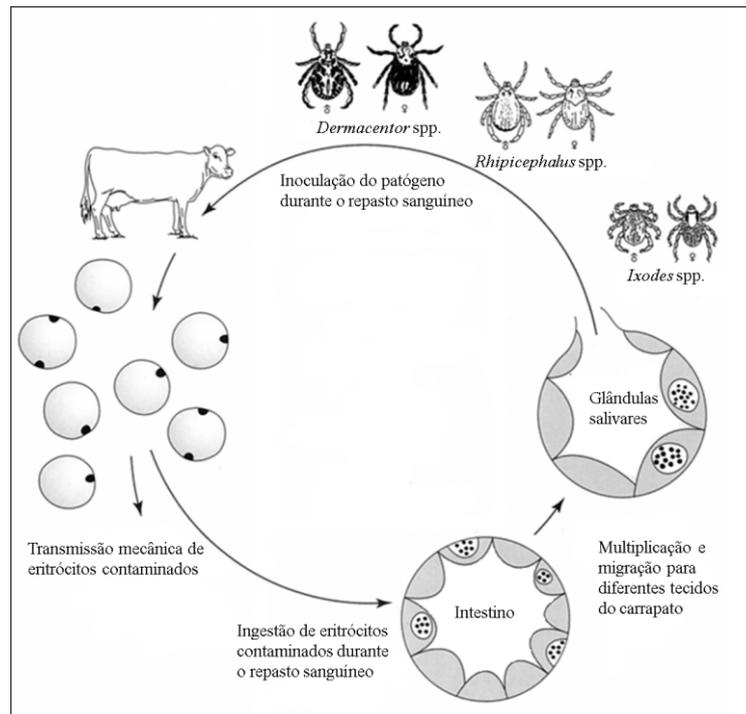
#### 3.5 Ciclo Biológico da *A. marginale*

No hospedeiro vertebrado, o ciclo biológico da *A. marginale* se inicia a partir da inoculação do patógeno no bovino pelo vetor invertebrado, que passa então a infectar as células eritrocitárias do hospedeiro vertebrado. O período de incubação é variável de 7 a 60

dias, sendo que a multiplicação da rickettsia se dá por fissão binária no citoplasma das células infectadas formando um vacúolo que pode conter de quatro a oito corpúsculos (KOCAN et al., 2003, 2010). Na fase inicial da infecção, ocorre o aumento exponencial dos eritrócitos infectados, mas esse aumento depende da suscetibilidade do hospedeiro, da dose infectante e da patogenicidade da cepa de Anaplasma (DE VOS; JORGENSEN, 1992; KOCAN et al., 2010; AUBRY; GEALE, 2011). Quando a infecção é detectada pelo sistema imune do hospedeiro vertebrado, os eritrócitos infectados são fagocitados por células do sistema reticuloendotelial do animal, o que leva a ocorrência da sintomatologia clínica, tais como anemia e icterícia sem ocorrência de hemoglobinúria. Os animais que sobrevivem à infecção tornam-se permanentemente infectados, atuando como reservatórios. Tais animais apresentam baixa parasitemia e contribuem para a manutenção da endemicidade da doença nos rebanhos (KOCAN et al., 2010).

No hospedeiro invertebrado, o ciclo biológico inicia com o repasto sanguíneo, uma vez que o sangue contém os eritrócitos infectados. As rickettsias ao chegarem no intestino do carrapato, infectam as células intestinais onde se desenvolvem e migram para outros tecidos do carrapato, incluindo as glândulas salivares, via esta utilizada para a transmissão da *A. marginale* para outros animais (KOCAN et al., 2010) (Figura 3).

**Figura 2:** Esquema do ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* em bovinos e carrapatos.



Fonte: Adaptado de Kocan et al., (2003).

### 3.6 Transmissão de patógenos por carrapatos (Acari: Ixodidae)

Os carrapatos estão distribuídos em três grandes famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (HORAK; CAMICAS; KEIRANS, 2002). Os carrapatos de interesse humano e veterinário pertencem à Ordem Acari, Família Ixodidae e pertencem aos gêneros *Ixodes*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Haemaphysalis*. No mundo, a transmissão biológica de *A. marginale* e *B. bovis* aos bovídeos é feita por aproximadamente 20 espécies de carrapatos dos gêneros *Rhipicephalus*, *Dermacentor* e *Ixodes* (JAIMES-DUEÑEZ; TRIANA-CHÁVEZ; MEJÍA-JARAMILLO, 2017). Quando o carrapato está fixado no hospedeiro vertebrado, a transmissão de patógenos não ocorre simultaneamente. É necessário um “tempo de transmissão” que varia de hospedeiro para hospedeiro e da espécie do carrapato. Na literatura, há poucos estudos dedicados a investigação do “tempo de transmissão” destes patógenos aos hospedeiros vertebrados, mas Eisen (2018) relatou que a transmissão do protozoário *Babesia microti*, agente etiológico da Babesiose humana, em hospedeiros experimentais, levou cerca de 36 h pelo carrapato *Ixodes scapularis*, enquanto que a bactéria *Anaplasma phagocytophilum*, responsável pela Anaplasmose humana e transmitida também pelo carrapato *I. scapularis*, leva cerca de 24 h.

### 3.6.1 Classificação dos gêneros da família Ixodidae

A classificação taxonômica (Woolley, 1988) é a seguinte:

**Reino:** Animalia

**Filo:** Arthropoda

**Classe:** Arachnida

**Coorte:** Parasitiformes

**Ordem:** Ixodida

**Família:** Ixodidae

**Gênero:** *Ixodes*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Haemaphysalis*

### 3.7 Epidemiologia da Tristeza Parasitária Bovina

No Brasil, o principal vetor da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é o carrapato *R. microplus*. Infestações do hospedeiro vertebrado pelo carrapato-dos-bovinos estão intimamente relacionadas ao aparecimento e a gravidade dessa patologia. Os estudos epidemiológicos da TPB compreendem a investigação dos fatores relacionados aos vetores, ao meio ambiente e ao hospedeiro. Para isso, é necessário conhecer a distribuição e a dinâmica populacional dos vetores, assim como, a interação entre os vetores e o hospedeiro vertebrado, a taxa de infecção dos vetores no campo, a taxa de infecção dos bovinos, a idade dos animais afetados, a sazonalidade e os métodos utilizados para o controle dos vetores, e o manejo dos rebanhos. Os estudos epidemiológicos consideram cada um desses fatores a fim de indicar as melhores práticas de profilaxia indicadas para a prevenção e o controle de casos clínicos da TPB (SACCO, 2001; BRITO et al., 2013).

### 3.8 Estudos de validação de técnicas moleculares para diagnóstico da transmissão transplacentária de *A. marginale* e *B. bovis*

A utilização de microscopia de luz é uma técnica recomendada para diagnóstico de animais com altas taxas de parasitemia (sintomáticos), onde é possível visualizar os hemoparasitas a partir da realização de esfregaço de sangue periférico corado, porém, animais com baixa parasitemia (assintomáticos) não são diagnosticados e passam a não serem considerados na epidemiologia dos agentes causais da TPB (BRITO et al., 2013). No caso da transmissão transplacentária de *Babesia* spp. e *A. marginale*, os bezerros recém-nascidos

infectados mas sem sintomatologia clínica não são considerados como portadores dos agentes causais e também são excluídos dos dados epidemiológicos referentes a ocorrência e transmissão da TPB.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, como a PCR, nPCR e a qPCR (MULLIS, 1990; FIGUEROA et al., 1993; BILHASSI et al., 2014), novos estudos epidemiológicos sobre a transmissão transplacentária da Anaplasmosse e da Babesiose foram realizados, pois a partir de utilização de técnicas de maior sensibilidade e especificidade, a transmissão transplacentária tem sido evidenciada com maior frequência em animais recém-nascidos sintomáticos e assintomáticos, contribuindo significativamente para a realização de estudos mais abrangentes sobre essa via de infecção (GIRARDI et al., 2012; GRAU et al., 2013; SANTAROSA et al., (2013); COSTA et al., 2016; NAZAR et al., 2018).

### 3.8.1 Anaplasmosse

Os primeiros estudos sobre transmissão transplacentária da *A. marginale*, atestaram que animais recém-nascidos apresentam sintomas clínicos da infecção (NORTON; PARKER; FORBES-FAULKNER, 1983; POTGIETER; VAN RENSBURG, 1987). Ribeiro et al. (1995), detectaram através da técnica ELISA, a transmissão transplacentária de *A. marginale* em 2,06% (2/97) dos fetos examinados em abatedouro e em 36,36% (4/11) dos bezerros nascidos de vacas inoculadas, demonstrando assim que na fase aguda da doença a transmissão transplacentária pode ser uma via importante de infecção por *A. marginale*. Potgieter; Van Resburg (1987) na África do Sul, também investigaram a transmissão transplacentária por *A. marginale*, onde observaram uma taxa de transmissão de 15,6%, sugerindo que as taxas de transmissão transplacentária podem ter importância epidemiológica em algumas regiões. Grau et al. (2013) investigaram a incidência da transmissão transplacentária de *A. marginale* no Sul do Brasil, onde observaram a taxa de transmissão transplacentária de 10,5% (2/19) em bezerros recém-nascidos de vacas cronicamente infectadas. Nazar et al. (2018) investigaram a taxa de transmissão transplacentária de *A. marginale* e concluíram que 13,7% (4/29) bezerros recém-nascidos foram positivos para *A. marginale* (GIRARDI et al., 2012).

### 3.8.2 Babesiose

A transmissão congênita da *Babesia microti* já foi relatada em humanos (FOX et al., 2006; JOSEPH et al., 2012; KRAUSE; VANNIER, 2012). A transmissão transplacentária de *Babesia equi* em equinos também foi relatada e possivelmente, resultou na morte de dois equinos logo após o nascimento (CHHABRA et al., 2012). Yeruham et al. (2003) observou a presença de *B. bovis* em esfregaço de sangue periférico corado oriundo de bezerro com dois dias de idade. Santarosa et al. (2013) considerou a hipótese de transmissão congênita de *B. bovis* em uma bezerra com sete dias de vida que morreu devido a complicações neurológicas, sendo que o diagnóstico ocorreu por meio de avaliação citológica do sistema nervoso central. Bracarense e Vidotto (2001) identificaram a transmissão transplacentária de *B. bovis* que resultou em complicações e aborto de um bezerro que foi diagnosticado com *B. bovis* neurológica. Costa et al. (2016) diagnosticaram molecularmente bezerros recém-nascidos que não apresentavam sinais clínicos de *B. bovis*.

## 3.9 Técnicas Moleculares

### 3.9.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

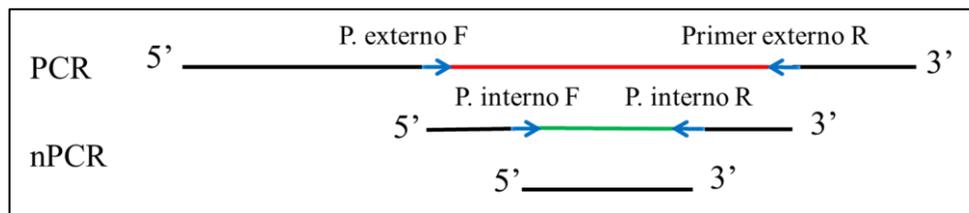
A técnica da PCR requer uma molécula de DNA, sequências iniciadoras de síntese (*primers*), desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), enzima DNA polimerase, íons de magnésio (cofator da polimerase) e solução tampão de reação. Os *primers* são responsáveis por flanquearem a sequência específica a ser amplificada, funcionando como um ponto de iniciação e terminação para a DNA polimerase. Os dNTPs são as quatro bases nucleotídicas – adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G) – que são usadas pela DNA polimerase para realizar a síntese da sequência alvo que originará o produto de amplificação da reação. A PCR possui três etapas: a desnaturação, a hibridização (*annealing*) e a extensão. Na desnaturação, a alta temperatura, em torno de 95 °C é responsável por separar a fita bifilamentar do DNA. Na hibridização, a temperatura é reduzida para permitir que os *primers* se hibridizem em cada uma das fitas unifilamentares, o que possibilita que a DNA polimerase inicie a incorporação dos dNTPs. Após o fim da PCR, os produtos amplificados são separados a partir de seu peso molecular através da técnica de eletroforese em gel de agarose. As bandas são visualizadas por meio da coloração com reagentes fluorescentes intercalantes de ácidos nucleicos, como brometo de etídeo e, outros corantes que possuem afinidade por ácidos

nucleicos (KUBISTA et al., 2006; ISHMAEL; STELLATO, 2008; GARIBYAN; AVASHIA, 2013).

### 3.9.2 Nested PCR (nPCR)

A especificidade e sensibilidade da PCR tem possibilitado o avanço nos estudos epidemiológicos da Babesiose em todo o mundo, principalmente, através da técnica de nested PCR (HIGUCHI et al., 1992; BRITO et al., 2013). Segundo Aubry e Geale (2010) a nested PCR é capaz de diagnosticar animais com taxas de parasitemia de apenas 0,0000001%. A nPCR é diferenciada pela introdução de um segundo passo de amplificação com novos *primers*, usando o material previamente amplificado pela PCR. Na nPCR, os *primers* nested hibridizam em uma região complementar presente no produto de amplificação da PCR convencional. A reação da nPCR necessita de uma alíquota dos produtos de PCR e de pelo menos, 30 ciclos de amplificação (FARREL JR, 2010).

**Figura 3:** Nested PCR. Após a amplificação utilizando *primers* externos (PCR), uma segunda amplificação (nPCR) é feita com *primers* internos que conferem maior especificidade, minimizando falsos positivos que possam ter sido amplificados na PCR.



Fonte: Adaptado de Farrel Jr (2010).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Autorizações legais para pesquisa, área experimental e animais

Todos os procedimentos relacionados à manipulação animal foram desenvolvidos de acordo com normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) utilizando metodologias aprovadas e fiscalizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa da Embrapa Rondônia (CEUA CPAF RO. N° 01/2015).

A colheita de moscas e carrapatos foi realizada de acordo com a Instrução Normativa N° 03 do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) de 01/09/2014, a qual regulamenta a colheita de material biológico para pesquisa mediante solicitação e

autorização via Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) com o número de identificação 60159-1.

Os estudos foram conduzidos em duas Fazendas Experimentais da Embrapa, sendo estas a Unidade de Produção Animal (UPA) Álvaro Adolfo da Embrapa Amazônia Oriental em Belém onde encontra-se estabelecido um rebanho bubalino de base genética Murrah e Mediterrâneo e, o Campo Experimental de Porto Velho da Embrapa Rondônia que mantém um rebanho bovino leiteiro mestiço Gir Leiteiro/Holandês com grau de sangue variável de  $\frac{1}{2}$  a  $\frac{3}{4}$  Holandês (Figura 6).

Na investigação da transmissão transplacentária, foram utilizadas dezesseis vacas bovinas gestantes e treze vacas gestantes bubalinas. Ambos os rebanhos são criados de forma isolada, sendo o controle sanitário de rotina constituído de vacinação contra a febre aftosa, brucelose e clostridioses, assim como controle de ecto e endoparasitas. Ambos os rebanhos avaliados mantêm escrituração zootécnica sendo as principais informações relativas à idade, peso ao nascimento, desmama, práticas de manejo sanitário e dados reprodutivos, às quais estão disponíveis em bancos de dados de cada uma das Unidades de Pesquisa que participaram do estudo.

**Figura 4:** Vaca bovina e seu bezerro utilizados no estudo.



**Foto:** Luciana Gatto Brito/Arquivo pessoal.

## 4.2 Colheita de amostras

### 4.2.1 Matrizes

Foram selecionadas vacas com prenhez positiva, em período gestacional entre dois e três meses de gestação, aferida através de ultra-sonografia intravaginal. As vacas gestantes foram submetidas mensalmente, a exame clínico geral, incluindo aferição da temperatura retal e exame de mucosas visíveis, quando também foram colhidas amostras de sangue da veia caudal em tubos contendo EDTA, sendo estas amostras utilizadas no estudo.

### 4.2.2 Bezerros

Amostras de sangue da veia caudal dos bezerros foram colhidas nas primeiras 24 horas de vida dos bezerros, quando também foi realizado o exame clínico dos animais constituído da aferição de temperatura retal e exame das mucosas visíveis além de se proceder as práticas de rotina, como a cura do umbigo. Para verificar a primo-infecção por *B. bovis* e *A. marginale*, bezerros que tenham nascidos infectados e livres de infecção foram submetidos mensalmente até os nove meses de idade aos mesmos procedimentos estabelecidos para os recém-nascidos.

### 4.2.3 Carrapatos e dípteros hematófagos

Mensalmente, foram colhidas amostras carrapatos e dípteros hematófagos que estavam infestando os animais. As teleóginas de cada colheita foram alocadas em placas de Petri descartáveis incubadas a  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa a  $85 \pm 5\%$  para que realizem a oviposição para posterior obtenção das larvas (Figura 7). Todas as amostras biológicas colhidas das matrizes e dos bezerros foram acondicionadas, identificadas e transportadas para o Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Oriental, onde foram processadas.

**Figura 5:** Teleóginas de *R. microplus*. A) Teleóginas antes da postura de ovos. B) Teleóginas após a postura de ovos.



**Foto:** Luciana Gatto Brito/Arquivo pessoal.

### 4.3 Extração e amplificação do DNA de hemoparasitas

#### 4.3.1 Extração de DNA das amostras de sangue

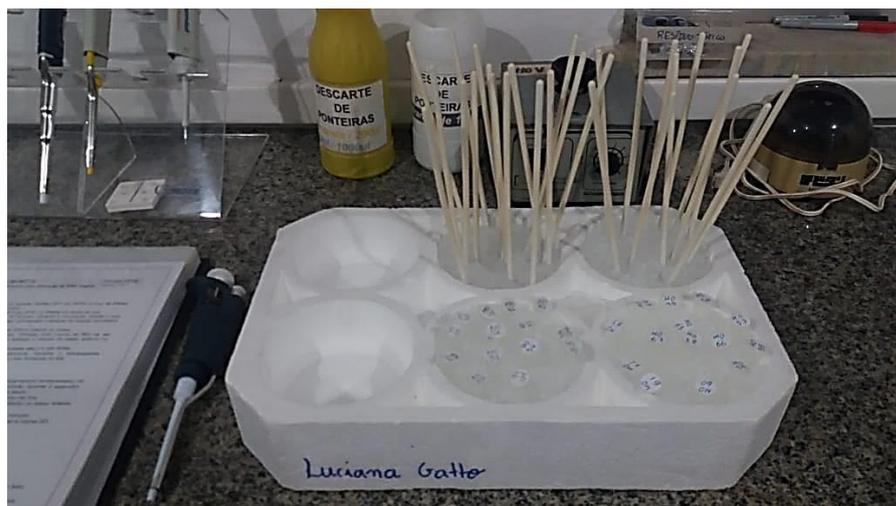
O DNA das amostras de sangue das vacas e dos bezerros foi extraído, a partir de 200  $\mu$ l de sangue utilizando-se o kit comercial GFX™ Genomic Blood DNA Purification (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram suspensas em 100  $\mu$ l de água ultra-pura na concentração final de 50  $\mu$ g/ml. Todas as amostras foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

#### 4.3.2 Extração de DNA das amostras de carrapatos e dípteros hematófagos

Para extração de DNA das amostras de dípteros hematófagos foi utilizada a metodologia descrita por Li et al. (2003). Após a coleta, cada exemplar foi submetido à sexagem usando uma lupa, onde a cabeça foi cortada e o corpo descartado, para evitar no caso das fêmeas, a contaminações com DNA oriundo de ovos, as amostras foram mantidas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração. Para extração, cada mosca foi colocada em microtubos de 1,5 ml resfriados e mantidos em gelo. As moscas foram então maceradas com auxílio de pistilo plástico também previamente resfriados em gelo por aproximadamente 15 segundos (Figura 8). Foram adicionados 25  $\mu$ l cloreto de potássio (KCl 500 mM, pH 8,0) e

novamente as moscas foram novamente maceradas com pistilo resfriado por cerca de 15 segundos. Após a maceração, os tubos foram rapidamente centrifugados para total homogeneização e incubados em banho-maria à 80 °C por 5 minutos. As amostras de DNA obtidas foram identificadas e armazenadas em freezer -80°C até o momento da pesquisa dos agentes da TPB.

**Figura 6:** Extração de DNA de dípteras hematófagos.



**Fonte:** Tassia Ferreira/Arquivo pessoal.

Para extração de DNA das larvas de carrapatos foi utilizado o protocolo descrito por Guerrero et al (2001). As larvas de carrapatos armazenadas a -80°C em tubos criogênicos foram transferidas para placas de Petri previamente resfriadas em gelo e colocadas em microtubos de 1,5 ml pré-resfriados e mantidos em gelo. As larvas foram individualizadas e maceradas com pistilo plástico descartável também previamente resfriados em gelo por aproximadamente 15 segundos. Foram adicionados 25 µl cloreto de potássio (KCl 500 mM, pH 8,0) e novamente a larva foi macerada com pistilo resfriado por cerca de 15 segundos. Após a maceração, os tubos contendo as larvas foram rapidamente centrifugados para total homogeneização da larva com o tampão de isolamento. Os tubos contendo as larvas fragmentadas e o tampão de isolamento foram incubadas a banho-maria por três a cinco minutos. O DNA extraído foi mantido em freezer a -20°C para uso imediato ou até duas semanas ou armazenado a -80°C para posterior análise.

#### 4.3.3 Reações de PCR e nPCR

As reações de PCR e nPCR foram realizadas utilizando as sequências iniciadoras (*primers*) descritas por Figueroa et al. (1993) e Brito et al. (2010), cujas descrições estão na Tabela 1. As reações de PCR convencional foram utilizadas para o diagnóstico de *A. marginale* nas amostras de DNA de vacas e bezerros e em agentes causais da TPB, enquanto que a nPCR foi empregada para o diagnóstico de *B. bovis* (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005; BRITO et al., 2010). As reações de PCR e nPCR foram utilizadas para o acompanhamento da primo infecção pelos agentes causais da TPB em bezerros bovinos diagnosticados como não infectados ao nascimento e para a avaliação da presença ou ausência dos agentes causais da TPB em espécimes da fauna entomológica parasitária de bovinos na Amazônia Oriental.

**Tabela 1:** Sequências iniciadoras (*primers*) internas e externas para amplificação de DNA de *A. marginale* e *B. bovis*.

Agente	Primer	Oligonucleotídeos (5' → 3')	Reação	Amplicon	Referência
<i>A. marginale</i>	msp5 F	CGC AGA TCT AGC AAA ATC GGC GAG AGG TTT ACC ACT TC	PCR	458 pb*	(BRITO et al., 2010)
	msp5 R	GCG CTG CAG TGG CGC AAA ATG CCC GAC ATA CC			
<i>B. bovis</i>	BoF	CAC GAG GAA GGA ACT ACC GAT GTT GA	PCR	350 pb*	(FIGUEROA et al., 1993)
	BoR	CCA AGG AGC TTC AAC GTA CGA GGT CA			
	BoFN	TCA ACA AGG TAC TCT ATA TGG CTA CC	nPCR	290 pb*	(FIGUEROA et al., 1993)
	BoRN	CTA CCG AGC AGA ACC TTC TTC ACC AT			

\*pares de bases

As reações de PCR foram feitas em tubos de 0,2 ml com volume final de 20 µl, sendo 2 µl da solução de DNA total (50 ng/µl) extraído das amostras de sangue, carrapatos ou dípteros e 10 µl de tampão de reação de amplificação Master Mix (Ampliqon, Odense, Dinamarca) com a seguinte composição (MgCl<sub>2</sub> 2 mM): Tris-HCl pH 8,5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,

MgCl<sub>2</sub> 4 mM, 0.4 mM de cada dNTP, 0.5 U/μl de Taq DNA Polimerase, 0.2% Tween<sup>®</sup> 20, vermelho inerte e estabilizador; 6 μl de água ultrapura (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil) e 1 μl de cada *primer* (10 ng/μL). Para prevenir a contaminação das reações de amplificação de DNA, foram adotadas as medidas de segurança recomendadas por Kwok e Higuchi (1989).

As condições para a amplificação do DNA de *B. bovis* foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; seguida de 38 ciclos com desnaturação a 94°C por um minuto e meio, hibridização a 61°C por 2 minutos para os *primers*, extensão a 72°C por um minuto e meio e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Enquanto que as condições para a amplificação do DNA de *A. marginale* foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; seguida de 38 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, hibridização a 58°C por 2 minutos para os *primers* msp5 F e msp5 R, extensão a 72°C por 7 minutos e extensão final a 72°C por 7 minutos. Todas as PCR e nPCR foram preparadas e incubadas com um controle positivo de *B. bovis* ou *A. marginale*. As reações ocorreram em termociclador Veriti<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific<sup>™</sup>, Massachusetts, EUA).

#### 4.3.4 Eletroforese

Após a realização da PCR e nPCR, os produtos de PCR foram analisados através da eletroforese em gel de agarose 2%, imerso em TAE 1X (TRIS 400 mM, Ácido Acético 1% e EDTA 20 mM), corado com GelRed<sup>™</sup> (Biotium, Fremont, USA), corrente de 100V/90mA por 90 minutos. Os produtos amplificados de *B. bovis* e *A. marginale* foram identificados pela comparação com marcadores de peso molecular de 100 pares bases (Norgen Biotek, Thorold, Canada). A visualização ocorreu em transiluminador de luz ultravioleta (L-PIX TOUCH). Os dados obtidos foram armazenados em planilhas para posterior cálculo das taxas de infecções em bovinos, carrapatos e moscas hematófagas.

## 5. ANÁLISE DOS DADOS

Para calcular a taxa de infecção molecular de *A. marginale* e *B. bovis* nas vacas e bezerros bovídeos, coinfeção em vacas bubalinas, nas larvas de carrapatos e nos dípteros hematófagos, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$ti = \frac{np \times 100}{nt}$$

- ✓ *ti*: a taxa de infecção molecular (%)
- ✓ *np*: o número de amostras positivas
- ✓ *nt*: o número total de amostras analisadas

O cálculo da taxa de coinfeção molecular de *A. marginale* e *B. bovis* em vacas bubalinas levou em consideração apenas as quatro vacas que foram positivas para ambos os hemoparasitas. Assim, a fórmula está descrita a seguir:

$$ti = \frac{4 \times 100}{13}$$

$$ti = 30,77\%$$

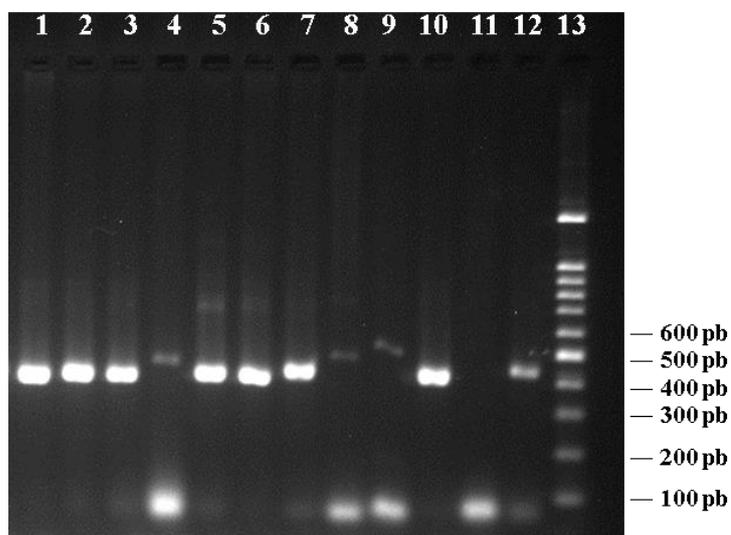
A análise estatística foi calculada com base nas taxas de infecção molecular de *A. marginale* e *B. bovis* nas vacas e bezerros bovídeos, nas larvas de carrapatos e nos dípteros hematófagos. O teste empregado foi: Duas Amostras Independentes, teste *Odds ratio* (OR), com nível de significância de 5%, sendo o pacote estatístico utilizado o BioEstat 5.3<sup>®</sup>.

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Taxa de infecção de *A. marginale* e *B. bovis* em vacas gestantes bovinas**

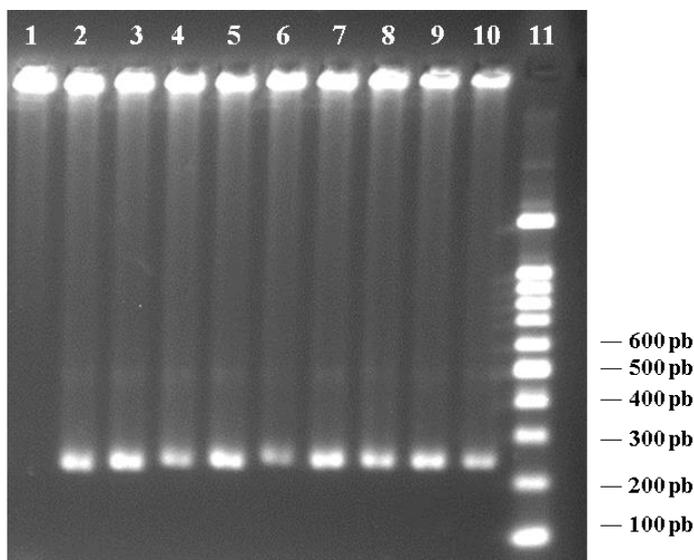
Os resultados demonstram que 100% (16/16) das vacas bovinas foram positivas pela amplificação do DNA de *A. marginale* (Figura 7) e 93,75% (15/16) das mesmas amostras de DNA das vacas bovinas foram positivas para a amplificação do DNA de *B. bovis* (Figura 8). Todas as vacas bovinas infectadas por *A. marginale* e *B. bovis* eram portadoras assintomáticas.

**Figura 7:** Eletroforese dos produtos de amplificação do DNA de *A. marginale* por PCR. Amostras positivas com bandas de 458 pares de bases. Poço 1 a 10 = PCRs positivas; Poço 11 = PCR negativa; Poço 12 = controle positivo; Poço 13 = marcador de peso molecular (100 pares de bases).



**Foto:** Tássia Ferreira/Arquivo pessoal.

**Figura 8:** Eletroforese dos produtos de amplificação do DNA de *B. bovis* por nPCR. Amostras positivas com bandas de 290 pares de bases. Poço 1 = PCR negativa; Poço 2 a 9 = PCRs positivas; Poço 10 = controle positivo; Poço 11 = marcador de peso molecular (100 pares de bases).



**Foto:** Tássia Ferreira/Arquivo pessoal.

A alta taxa de infecção em vacas bovinas por *B. bovis* corrobora com os resultados de Oliveira et al. (2005) que encontrou uma taxa infecção de *B. bovis* de 100% em vacas bovinas utilizando o diagnóstico molecular feito por PCR e nPCR. Añez-Rojas et al. (2010) também diagnosticou vacas bovinas gestantes assintomáticas para *A. marginale*, onde 70,9% (22/31) estavam infectadas, mas sem apresentarem sintomas clínicos da Anaplasmoze.

Mahoney e Ross (1972), definiram que em uma área de estabilidade enzoótica, 75% dos animais com idade acima de 9 meses estão infectados pelo hemoparasita *B. bigemina* ou *B. bovis*, agentes causadores da Babesiose bovina. Apesar de estarem infectados, esses animais não desenvolvem sintomas clínicos porque foram infectados nos primeiros meses de vida (primo-infecção). A infecção é mantida constante nesses animais até a idade adulta pelas constantes reinfecções promovidas pelos carrapatos presentes no mesmo ambiente. Nas áreas de estabilidade enzoótica, os animais adultos não se encontram sujeitos a surtos de Babesiose, pois esses animais possuem imunidade adquirida em relação à doença (GONÇALVES, 2000). Em relação à análise estatística, não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as taxas de infecção encontradas para *B. bovis* e *A. marginale* nas vacas bovinas.

## **6.2 Taxa de infecção de *A. marginale* e *B. bovis* em vacas gestantes bubalinas**

Os resultados demonstram que 61,54% (8/13) das vacas bubalinas foram positivas pela amplificação do DNA de *A. marginale* e 53,84% (7/13) *B. bovis*. Todas as vacas bubalinas infectadas por *A. marginale* e *B. bovis* também eram portadoras assintomáticas.

A taxa de infecção molecular das vacas gestantes bubalinas de 61,54% para *A. marginale* (8/13) foi maior do que a encontrada por SILVA et al. (2014) que encontrou uma taxa de 7,5% (15/200) em rebanho bubalino localizado na ilha do Marajó, Brasil. O diagnóstico molecular foi feito por PCR.

SILVA et al. (2014) também afirmou que os búfalos infectados não apresentavam sintomas clínicos da Anaplasmosse e que esses animais passam a atuar como reservatórios para a infecção de *A. marginale* para rebanhos bovinos criados nas proximidades.

A taxa de infecção molecular das vacas gestantes bubalinas de 53,84% para *B. bovis* (7/13) foi maior do que a encontrada por SILVA et al. (2013) que encontrou uma taxa de 41,2% (223/542) em rebanho bubalino localizado no estado do Pará, Brasil, sendo o diagnóstico feito por PCR. Além disso, SILVA et al. (2013) também concluiu que vacas gestantes bubalinas são mais suscetíveis a estarem infectadas por *B. bovis* do que vacas bubalinas não gestantes.

A taxa de coinfeção de *A. marginale* e *B. bovis* nas vacas bubalinas foi de 30,77% (4/13). Obregón et al. (2019) também investigaram a coinfeção de *A. marginale* e *B. bovis* e encontraram uma taxa de 26% em rebanho bubalino. O diagnóstico molecular foi feito por PCR e nPCR.

Em relação à análise estatística, não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as taxas de infecção encontradas para *B. bovis* e *A. marginale* nas vacas bubalinas.

### **6.3 Taxa de infecção da transmissão transplacentária de *A. marginale* e *B. bovis* em bezerros bovinos**

As taxas de infecção dos bezerros bovinos ao nascimento foram de 81,25% (13/16) para *A. marginale* e *B. bovis*. Todos os bezerros nascidos infectados eram portadores assintomáticos, assim como suas respectivas mães.

Os primeiros relatos da transmissão transplacentária da *A. marginale* foram feitos por (NORTON; PARKER; FORBES-FAULKNER, 1983; POTGIETER; VAN RENSBURG, 1987) que observaram que bezerros bovinos recém-nascidos apresentam sintomas clínicos da infecção por *A. marginale*.

Ribeiro et al. (1995), detectaram a transmissão transplacentária de *A. marginale* em 2,06% (2/97) dos fetos examinados em abatedouro e em 36,36% (4/11) dos bezerros nascidos de vacas com sintomas clínicos da infecção. Demonstrando assim que na fase aguda da doença, a transmissão transplacentária ocorre e é uma importante via de infecção por *A. marginale*. Na América do Sul, Añez-Rojas et al. (2010) investigaram a transmissão transplacentária em bezerros bovinos recém-nascidos assintomáticos e concluíram que 40,9% (9/22) dos bezerros nasceram assintomáticos para *A. marginale*, sendo o diagnóstico realizado por PCR.

Grau et al. (2013) investigaram a incidência da transmissão transplacentária de *A. marginale* e encontraram uma taxa de transmissão vertical de 10,5% (2/19) em bezerros recém-nascidos filhos de vacas cronicamente infectadas utilizando diagnóstico por PCR. Nazar et al. (2018) investigaram a taxa de transmissão transplacentária de *A. marginale* e concluíram que 13,7% (4/29) bezerros recém-nascidos foram positivos para a presença de *A. marginale*, sendo que o diagnóstico também realizado por PCR

Os resultados da transmissão transplacentária de *B. bovis* obtidos nesse estudo corroboram outros relatos referentes a esta via de transmissão de *B. bovis* em bezerros bovinos neonatos realizados por Bracarense; Vidotto (2001), Yeruham et al. (2003), Santarosa et al. (2013), mas se nota que esses estudos são limitados a casos de bezerros que apresentam sintomas clínicos de infecção logo após o nascimento, enquanto que os animais recém-nascidos infectados assintomáticos não são considerados e por isso excluídos da

epidemiologia da infecção. Por outro lado, Costa et al. (2016) relataram a transmissão transplacentária de *B. bovis* em bezerros recém-nascidos (4/60) que não apresentavam sintomas clínicos.

Com isso, se sugere que a transmissão transplacentária da Anaplasmose e da Babesiose ocorre precocemente através da placenta da mãe para o filho na maioria dos casos em que as mães encontram-se infectadas, sendo esta uma importante via de transmissão para os bezerros bovinos tanto para *A. marginale* quanto para *B. bovis*, uma vez que os animais já nascem infectados e contribuem para a manutenção da endemicidade da TPB nos rebanhos.

A análise estatística não demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as taxas de infecção transplacentária encontradas para *B. bovis* e *A. marginale* nos bezerros bovinos.

#### **6.4 Taxa de infecção da transmissão transplacentária de *A. marginale* e *B. bovis* em bezerros bubalinos**

As taxas de infecção dos bezerros bubalinos ao nascimento foram de 23,08% (3/13) para *A. marginale* e 30,77% (4/13) para *B. bovis*. Todos os bezerros bubalinos eram portadores assintomáticos, assim como suas respectivas mães.

A transmissão transplacentária de *A. marginale* já foi relatada em bovinos por Costa et al. (2016), Potgieter; Van Rensburg (1987), Rojas-Martínez et al. (2018), mas não há estudos que investiguem a via transplacentária de *A. marginale* em búfalos. Em relação à transmissão transplacentária de *B. bovis*, também só há estudos sobre bovinos como Bracarense; Vidotto (2001), Yeruham et al., (2003), Santarosa et al., (2013), Costa et al. (2016).

Os resultados obtidos nesse estudo evidenciam que a transmissão transplacentária de *B. bovis* em búfalos ocorre, assim como em bovinos. Em relação a *A. marginale*, Silva et al. (2014) consideram que a transmissão transplacentária desempenha importante papel na endemicidade de *A. marginale* em búfalos, uma vez que os rebanhos bubalinos normalmente não apresentam-se infestados por *R. microplus*, mas apresentam-se como portadores assintomáticos de *A. marginale*. Os resultados obtidos demonstram de forma pioneira a ocorrência da transmissão transplacentária de *A. marginale* e *B. bovis* em bubalinos.

Em relação à análise estatística, não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as taxas de infecção transplacentária encontradas para *B. bovis* e *A. marginale* nos bezerros bubalinos.

### 6.5 Taxa de infecção de *A. marginale* e *B. bovis* em larvas de carrapatos coletados em rebanho bovino.

Os resultados demonstraram que 44,4% (200/450) das larvas de carrapatos obtidas de teleóginas colhidas no rebanho bovino foram positivas pela amplificação do DNA de *A. marginale* e, 55,9% (247/450) das larvas foram positivas pela amplificação do DNA de *B. bovis*.

As taxas de infecções encontradas nas larvas dos carrapatos corroboram com as observações feitas por Guglielmone (1995) que considerou que o carrapato *R. microplus* é o principal vetor de *A. marginale* e *B. bovis* nas Américas. A taxa de infecção de *B. bovis* nas larvas de *R. microplus* demonstram a importância epidemiológica do carrapato-dos-bovinos na manutenção das taxas de infecção no hospedeiro vertebrado. Além disso, a taxa encontrada está muito acima da taxa de 0,9% encontrada por Øines et al. (2012) na investigação de *Babesia* spp. em carrapatos *Ixodes ricinus*.

A análise estatística comparou as taxas de infecção encontradas para *B. bovis* e *A. marginale* nas larvas de carrapato. O valor 1,52 de OR que demonstra a presença de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) sugere que as larvas de *R. microplus* são mais propícias a estarem infectadas por *B. bovis* do que por *A. marginale*. Por exemplo, a cada 1 larva de carrapato infectada por *A. marginale*, há 1,5 larva de carrapato infectada por *B. bovis*. Se 15 larvas de carrapato forem pesquisadas, provavelmente, as 15 larvas estarão infectadas por *B. bovis* e somente 10 estarão infectadas por *A. marginale* (Tabela 2).

**Tabela 2:** Comparação estatística entre as taxas de infecção encontradas para *B. bovis* e *A. marginale* em larvas de carrapatos coletados em rebanho bovino.

Artrópode	Hemoparasita	n	+ (%)	OR	IC 95%	p
Larvas de carrapato	<i>B. bovis</i>	450	247 (55,9%)	1,52	1,17 – 1,98	0,002*
	<i>A. marginale</i>		200 (44,4%)			

n (número total de artrópodes avaliados); + (%) (número e porcentagem de artrópodes infectados – PCR e nPCR); OR (“Odds ratio”); IC (Intervalo de Confiança - 95%); p (Probabilidade); \* = significância a 0,05.

O rebanho bubalino avaliado não encontrava-se infestado por carrapatos, o que inviabilizou a investigação da taxa de infecção para *A. marginale* e *B. bovis* em carrapatos que realizaram repasto sanguíneo em búfalos. A ausência dos carrapatos no rebanho bubalino estudado está de acordo com as observações feitas por SILVA et al. (2014) que investigou a baixa diversidade de ectoparasitas associada a infecção por *A. marginale* em búfalos na ilha do Marajó, Brasil.

#### **6.6 Taxa de infecção de *A. marginale* e *B. bovis* em dípteras hematófagos coletadas em rebanho de bovídeos.**

Os resultados demonstraram que a taxa de infecção encontrada em *H. irritans* coletadas no rebanho bovino avaliado foi de 11,4% (27/236) para *A. marginale* e de 9,3% (22/236) para *B. bovis*, enquanto que em *S. calcitrans* coletadas no rebanho bubalino foi de 1,5% (1/65) para *A. marginale* e de 12,3% (8/65) para *B. bovis*.

Esse foi o primeiro estudo epidemiológico que investigou a taxa de infecção de *A. marginale* e *B. bovis* em dípteras hematófagos parasitas de rebanhos de bovídeos na Amazônia. As dípteras hematófagos *H. irritans* e *S. calcitrans* apresentavam em suas probóscitas os agentes patogênicos causadores da Anaplasmoze e da Babesiose em bovídeos, corroborando com Guglielmone (1995), Scoles et al. (2005) e Baldacchino et al. (2013) que afirmaram que dípteras hematófagos podem atuar como vetores mecânicos de *A. marginale*. Entretanto, a presença de *B. bovis* na probóscita dessas dípteras foi um resultado não esperado e, demonstra que estudos devem ser realizados a fim de evidenciar a participação de dípteras hematófagos na epidemiologia de *B. bovis*. Comparando as taxas de infecção em larvas de carrapatos com as taxas de infecção nos dípteras hematófagos *H. irritans* e *S. calcitrans*, se evidencia que a transmissão biológica promovida por carrapatos é mais eficiente do que a transmissão mecânica promovida por dípteras hematófagos, corroborando com os resultados observados por Scoles; Miller; Foil (2008).

A análise estatística comparou as taxas de infecção encontradas para *B. bovis* e *A. marginale* em *H. irritans*. O valor 0,8 de OR demonstra que não há diferença estatística ( $p < 0,05$ ), demonstrando que ambos os dípteros hematófagos podem estar infectados por *B. bovis* e *A. marginale* na mesma proporção (Tabela 3). A análise estatística comparou as taxas de infecção encontradas para *B. bovis* e *A. marginale* em *S. calcitrans*. O valor 8,98 de OR com diferença estatística ( $p < 0,05$ ) sugere que esses dípteros hematófagos são mais suscetíveis a

estarem infectadas por *B. bovis* do que por *A. marginale*. Por exemplo, a cada 1 *S. calcitrans* infectada por *A. marginale*, há 8,98 *S. calcitrans* infectadas por *B. bovis* (Tabela 3).

**Tabela 3:** Comparação estatística entre as taxas de infecção encontradas para *B. bovis* e *A. marginale* em *H. irritans* coletadas em rebanho bovino e *S. calcitrans* coletadas em rebanho bubalino.

Artrópode	Hemoparasita	n	+ (%)	OR	IC 95%	p
<i>H. irritans</i> (Bovinos)	<i>B. bovis</i>	236	22 (9,3%)	0,8	0,44 – 1,44	0,546
	<i>A. marginale</i>		27 (11,4%)			
<i>S. calcitrans</i> (Bubalinos)	<i>B. bovis</i>	65	8 (12,3%)	8,98	1,09 – 74,04	0,038*
	<i>A. marginale</i>		1 (1,5%)			

n (número total de artrópodes avaliados); +(%) (número e porcentagem de artrópodes infectados – PCR e nPCR); OR (“Odds ratio”); IC (Intervalo de Confiança - 95%); p (Probabilidade); \* = significância a 0,05.

## 7. CONCLUSÃO

- As taxas da transmissão transplacentária de *A. marginale* de *B. bovis* no rebanho bovino e no bubalino estudados revelam que esta é uma importante via de infecção e contribui para a manutenção da endemicidade destes parasitas e possuem importância na epidemiológica dos agentes causais da TPB.
- As altas taxas de infecção por *B. bovis* e *A. marginale* encontradas nas larvas do carrapato *R. microplus* confirmam que esse artrópode parasita é o principal vetor dos agentes causadores da TPB também na Amazônia, sendo a transmissão transovariana uma importante via de infecção para *R. microplus*, artrópode até o momento identificado como de maior importância para a transmissão biológica dos hemoparasitas causadores da TPB.
- As taxas de infecção por *A. marginale* encontradas em *H. irritans* e *S. calcitrans* devem ser consideradas na epidemiologia da TPB, pois evidencia que esses dípteros hematófagos atuam como vetores mecânicos deste agente etiológico da TPB nos rebanhos de bovídeos na Amazônia, sendo necessária a continuidade dos estudos relacionados a participação destes dípteros na epidemiologia de *B. bovis*.
- Estudos adicionais são necessários a fim de aprimorar os conhecimentos referentes a participação das vias de infecção que contribuem para a manutenção da endemicidade da TPB nos rebanhos de bovídeos criados em áreas de estabilidade enzoótica na Amazônia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AÑEZ-ROJAS, N. et al. Detección de transmisión transplacentaria de *Anaplasma marginale* en bovinos asintomáticos. **Revista Científica FCV de LUZ**, n. 4, p. 377–382, 2010.
- AUBRY, P.; GEALE, D. W. A review of Bovine anaplasmosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, n. 1, p. 1–30, 2011.
- AYRES M., AYRES JR M., AYRES D.L., SANTOS A.A.S. **BioEstat 5.0 - Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas**. Belém, Pará: Sociedade Civil Mamirauá, 2007.
- BALDACCHINO, F. et al. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. **Parasite**, v. 20, n. 26, p. 1–13, 2013.
- BATTILANI, M. et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 49, p. 195–211, 2017.
- BENITEZ, D.; CETRÁ, B.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Ticks can Complete their Life Cycle on the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Buffalo Science**, v. 1, p. 193–197, 2012.
- BILHASSI, T. B. et al. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 234–238, 2014.
- BOCK, R. et al. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, n. S247–S269, p. 23, 2004.
- BRACARENSE, A.P.F.L., VIDOTTO, O., CRUZ, G.D. Transmissão congênita de *Babesia bovis*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.** v.53, n.4, P.1-3, 2001.
- BRITO, L. G. et al. Aspectos epidemiológicos da babesiose bovina na Amazônia sul ocidental: avaliação molecular. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 46, p. 1–23, 2007.
- BRITO, L. G. et al. *Anaplasma marginale* infection in cattle from south-western Amazonia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 249–254, 2010.
- BRITO, L. G. et al. *Babesia bovis* infection in cattle in the southwestern Brazilian Amazon. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 1–2, p. 78–82, 2013.
- BROWN, W. C. et al. Immune control of *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 75–87, 2006.
- BULING, A. et al. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1–2, p. 16–25, 2007.
- CHAUVIN, A. et al. *Babesia* and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, 2009.

- CHHABRA, S. et al. Transplacental transmission of *Babesia equi* (*Theileria equi*) from carrier mares to foals. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 36, n. 1, p. 31–33, 2012.
- COSTA, S. C. L. et al. Transplacental transmission of bovine tick-borne pathogens: Frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic stability in the northeast of Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 2, p. 270–275, 2016.
- DA SILVA, J. B. et al. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the north region of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 678–681, 2013.
- DE VOS, A. J.; JORGENSEN, W. K. Protection of Cattle Against Babesiosis in Tropical and Subtropical Countries with a Live, Frozen Vaccine. In: **Tick Vector Biology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992. p. 159–174.
- EISEN, L. Pathogen transmission in relation to duration of attachment by *Ixodes scapularis* ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 3, p. 535–542, 2018.
- EVERITT, J. I. et al. Experimental *Babesia bovis* infection in Holstein calves. **Veterinary pathology**, v. 23, n. 5, p. 556–562, 1986.
- FARRELL JR, R. E. **RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization**. 4<sup>a</sup> edition. San Diego: Elsevier, 2010, p.428–429.
- FIGUEROA, J. V. et al. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 1–2, p. 69–81, 1993.
- FLORIN-CHRISTENSEN, M. et al. Vaccines against bovine babesiosis: Where we are now and possible roads ahead. **Parasitology**, v. 141, n. 12, p. 1563–1592, 2014.
- FOX, L. M. et al. Neonatal babesiosis: case report and review of the literature. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 25, n. 2, p. 169–173, 2006.
- GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase chain reaction. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 3, p. 1–4, 2013.
- GIRARDI, A. M. et al. Anaplasmosose congênita em bezerra (*Bos indicus*) da raça Nelore - relato de caso. **Nucleus Animalium**, v. 4, n. 1, p. 89–95, 2012.
- GONÇALVES, P. Epidemiologia E Controle Da Tristeza Parasitária Epidemiology and Control of Bovine Babesiosis and. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 187–194, 2000.
- GRAU, H. E. G. et al. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 22, n. 2, p. 189–93, 2013.
- GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

GUERRERO, F. D.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J. Use of an Allele-Specific Polymerase Chain Reaction Assay to Genotype Pyrethroid Resistant Strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 1, p. 44–50, 2001.

GUGLIELMONE, A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in Sotun and Central America. **Veterinary parasitology**, v. 57, p. 109–119, 1995.

HIGUCHI, R. et al. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. **Nature**, v. 10, n. 4, p. 413–417, 1992.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa da Pecuária Municipal, 2017**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>>. Acesso em 06/11/2018 às 16:48.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia, Lea & Febinger. 1993, p.417.

HOMER, M. J. et al. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 3, p. 451–469, 2000.

HORAK, I. G.; CAMICAS, J. L.; KEIRANS, J. E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): A world list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, n. 1–4, p. 27–54, 2002.

ISHMAEL, F. T.; STELLATO, C. Principles and applications of polymerase chain reaction : basic science for the practicing physician. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 101, n. 4, p. 437–443, 2008.

JAIMES-DUEÑEZ, J.; TRIANA-CHÁVEZ, O.; MEJÍA-JARAMILLO, A. M. Parasitological and molecular surveys reveal high rates of infection with vector-borne pathogens and clinical anemia signs associated with infection in cattle from two important livestock areas in Colombia. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 2, p. 290–299, 2017.

JOSEPH, J. T. et al. Vertical Transmission of *Babesia microti*, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 8, p. 535–543, 2012.

KESSLER, R. H. et al. Babesiose Cerebral por *Babesia bovis* (Babés 1888 Starcovici 1893) em Bezerros, no Estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 18, n. 8, p. 931–935, 1983.

KOCAN, K. M. et al. Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 698–712, 2003.

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

KRAUSE, P. J.; VANNIER, E. Transplacental Transmission of Human Babesiosis.

**Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 20, n. 6, p. 365–366, 2012.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 2006.

KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, v. 339, p. 237–238, 1989.

LI, A. et al. Survey of Resistance to Permethrin and Diazinon and the Use of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay to Detect Resistance Alleles in the Horn Fly, *Haematobia irritans irritans* (L.). **Journal of medical entomology**, v. 40, n. 6, p. 942–949, 2003.

LIS, K. et al. Molecular and immunological characterization of three strains of *Anaplasma marginale* grown in cultured tick cells. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 4, p. 522–529, 2015.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootical factor in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 1, p. 292–298, 1972.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. **Advances in Parasitology**, v. 23, p. 37–103, 1984.

MOSQUEDA, J. et al. Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 1504–1518, 2012.

MULLIS, B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, n. April, p. 56–65, 1990.

NAZAR, M. et al. Occurrence and transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in dairy cattle. **Slovenian Veterinary Research**, v. 55, n. 3, p. 183–191, 2018.

NORTON, J. H.; PARKER, R. J.; FORBES-FAULKNER, J. C. Neonatal anaplasmosis in a calf. **Australian veterinary journal**, v. 60, n. 11, p. 348, 1983.

OBREGÓN, D. et al. High co-infection rates of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* in water buffalo in Western Cuba. **Parasitology Research**, 2019.

ØINES, Ø. et al. Prevalence and diversity of *Babesia* spp. in questing *Ixodes ricinus* ticks from Norway. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2012.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. et al. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 1, p. 105–111, 2005.

OLIVEIRA, M. C. S. et al. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 61–67, 2005.

POTGIETER, F. T.; VAN RENSBURG, L. The persistence of colostral *Anaplasma*

antibodies in incidence of *in utero* transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. July, p. 557–560, 1987.

ROJAS-MARTÍNEZ, C. et al. Bovine babesiosis: Cattle protected in the field with a frozen vaccine containing *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* cultured *in vitro* with a serum-free medium. **Parasitology International**, v. 67, n. 2, p. 190–195, 2018.

SACCO, A. M. S. Controle/Profilaxia da Tristeza Parasitária Bovina. **Comunicados Técnicos Embrapa**, v. 38, p. 1–3, 2001.

SANTAROSA, B. P. et al. Infecção neurológica por *Babesia bovis* em bovino neonato – relato de caso. **Vet. Zootec**, v.20, p.447-452, 2013.

SCHNITTGER, L. et al. Babesia: A world emerging. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1788–1809, 2012.

SCOLES, G. A. et al. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 4, p. 668–675, 2005.

SCOLES, G. A.; MILLER, J. A.; FOIL, L. D. Comparison of the Efficiency of Biological Transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae) with Mechanical Transmission by the Horse Fly, *Tabanus fuscicostatus* Hine (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 1, p. 109–114, 2008.

SILVA, J. B. et al. Low genetic diversity associated with low prevalence of *Anaplasma marginale* in water buffaloes in Marajó Island, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 801–804, 2014.

SUAREZ, C. E.; NOH, S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 6221, p. 109–125, 2011.

TALKHAN, O. F. A.; RADWAN, M. E. I.; ALI, M. A. Cattle babesiosis and associated biochemical alteration in Kalubya Governorate. **Nature and Science**, v. 12, n. 3, p. 24–27, 2010.

TAYLOR M.A., COOP R.L., WALL R. **Parasitologia Veterinária**. 3ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara - Koogan, 2010, p. 103–107.

TRINDADE, H. I.; ALMEIDA, K. Z.; FREITAS, F. L. C. Tristeza parasitária bovina - Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 16, p. 1679–7353, 2011.

UILENBERG, G. Veterinary Significance of Ticks and Tick-Borne Diseases. In: **Tick Vector Biology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992, p. 23–33.

WOOLLEY, T. A. **Acarology: Mites and Human Welfare**. John Wiley, New York, 1988, p. 484.

YERUHAM, I. et al. Intra-uterine infection with *Babesia bovis* in a 2-day-old calf. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 50, n. 2, p. 60–62, 2003.

ZIAPOUR, S. P.; ESFANDIARI, B.; YOUSSEFI, M. R. Study of the Prevalence of Babesiosis in Domesticated Animals with Suspected Signs in Mazandaran Province, North of Iran, During 2008. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 10, n. 6, p. 712–714, 2011.