

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



**Dissertação**

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO E NÍVEIS DE PROTEÇÃO SOROLÓGICA  
EM TERNEIROS VACINADOS CONTRA TRISTEZA PARASITÁRIA  
BOVINA COMPARADOS AOS NATURALMENTE INFECTADOS POR  
CARRAPATOS**

**Álvaro Carlos Menezes Arteche**

Pelotas, 2011

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO E NÍVEIS DE PROTEÇÃO  
SOROLÓGICA EM TERNEIROS VACINADOS CONTRA  
TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA COMPARADOS AOS  
NATURALMENTE INFECTADOS POR CARRAPATOS**

**ÁLVARO CARLOS MENEZES ARTECHE**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Nara Amélia da Rosa Farias, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (MS).

**PELOTAS**

**Rio Grande do Sul – Brasil**

**Novembro, 2011**

**Dados de catalogação na fonte:**

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

A786a

Arteche, Álvaro Carlos Menezes

Avaliação do desempenho e níveis de proteção sorológica em terneiros vacinados contra tristeza parasitária bovina comparados aos naturalmente infestados por carrapatos / Álvaro Carlos Menezes Arteche. – Pelotas, 2011. – 79f. ; gráf. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Medicina veterinária preventiva. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2011. - Orientador Nara Amélia da Rosa Farias.

1.VETERINÁRIA. 2.*BABESIA BOVIS*. 3.VACINA.  
4.*BABESIA BIGEMINA*. 5.CARRAPATO. 6.*ANAPLASMA MARGINALE*.  
7.*RHIPICEPHALUS BOOPHILUS MICROPLUS*. 8.*ANAPLASMA CENTRALE*. 9.ANTICORPOS. 10.TRISTEZA BOVINA.  
11.IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA I.FARIAS, NARA AMÉLIA DA ROSA. II.TÍTULO.

CDD: 636.20896968

ÁLVARO CARLOS MENEZES ARTECHE

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO E NÍVEIS DE PROTEÇÃO  
SOROLÓGICA EM TERNEIROS VACINADOS CONTRA  
TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA COMPARADOS AOS  
NATURALMENTE INFECTADOS POR CARRAPATOS

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Nara Amélia da Rosa Farias, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (M.S.).

Orientadora: Profa. Dra. Nara Amélia da Rosa Farias

PELOTAS

Rio Grande do Sul – Brasil

Novembro, 2011

**Banca examinadora**

Dr. Jerônimo Lopes Ruas

Dr. Paulo Bretanha Ribeiro

Dra. Emanuelle Baldo Gaspar

*“ Assim sendo, vaidade por ventura não será, acreditar após muitos mezes de trabalhos fatigantes, na luta de uma centena de imunizações, que algum serviço – embora pequeno – possamos prestar com o nosso compendio aos que se dedicam ao assumpto, thecnica ou economicamente.”*

Drs. Affonso Fonseca e Americo Braga  
Do livro: “Noções sobre a Tristeza Parasitária dos Bovinos”  
Rio de Janeiro, 1924.

Aos meus amados pais  
Carlos Cypriano Píffero Arteché e  
Daisy Menezes Arteché.  
A minha esposa Elida  
e filha Sophia.

## Agradecimentos

Sou muito grato, primeiramente, a Dra. Nara Farias por ter me aprovado e aceitado no curso de mestrado da faculdade de veterinária da UFPel.

Aos meus pais Daisy, amada mãe, por todo o apoio e compreensão e Carlos, igualmente amado pai, por ser o meu maior mestre e estimulador, professor dos professores, grande exemplo de seriedade, respeito, educação, força de vontade, dignidade, responsabilidade, pesquisador de fundamento e caráter impecável.

Agradeço a minha querida esposa Elida por todo o auxílio e estímulo em todos os momentos que precisei.

A minha filha Sophia a quem, mesmo sem ela saber ainda, sou muitíssimo grato por ela ter nascido em um momento de extrema “turbulência” em minha vida, um pai com excesso de atividades, que teve como grande estímulo para seguir em frente: a princesa Sophia!

A minha irmã Laura que, embora longe, está sempre pronta para ajudar.

Ao Dr. Nilton (Niltinho), sempre disposto a ajudar, por todas as dicas, pela ajuda incondicional sempre que precisei, pelo grande auxílio com as análises estatísticas, pela educação e coleguismo.

Aos Drs. Professores e demais componentes da equipe do laboratório de Parasitologia pelas excelentes aulas e por me receberem sempre com um sorriso amigável.

Ao Dr. Telmo Vidor e toda sua equipe pelos excelentes ensinamentos para a profissão e para a vida.

A Dra. Claudia Gomes, por permitir o processamento das amostras no laboratório de hemoparasitologia da EMBRAPA-Bagé.

Ao técnico Bernardo (EMBRAPA-Bagé) pela paciência em ensinar a técnica de RIFI, pelo auxílio no processamento das amostras e pela educação e respeito com que fui tratado.

Ao amigo e Eng. Agrônomo Mauricio Simões Pires pela confiança em ceder a sua propriedade rural e animais para a realização deste trabalho.

Ao amigo Eng. Agrônomo Rogério Falcão sempre pronto para ajudar.

Ao colega Filipe Apolo pelo auxílio na etapa de campo do experimento.

Aos animais experimentais que, graças a eles, milhares de outros animais deixarão de morrer de tristeza parasitária bovina!

## RESUMO

ARTECHE, Álvaro Carlos Menezes. **Avaliação do desempenho e níveis de proteção sorológica em terneiros vacinados contra tristeza parasitária bovina (TPB) comparados aos naturalmente infestados por carrapatos.** 2011. 79f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

Avaliaram-se, pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e de pesagens individuais, os níveis de proteção e ganho de peso de terneiros de corte do nascimento ao desmame com oito meses de idade que receberam duas doses de vacina contra tristeza bovina e foram mantidos livres de carrapatos em comparação a terneiros naturalmente infestados em condições de manejo extensivo com pastoreio contínuo em propriedade rural localizada no município de Santana do Livramento-Espinilho/RS. Formaram-se dois grupos aleatoriamente, n=30, sendo o GRUPO I (teste) mantido livre de carrapatos desde o nascimento até o desmame e com duas doses da vacina atenuada, trivalente e refrigerada contra tristeza bovina. O GRUPO II, controle, seguiu o manejo tradicional da propriedade, que reflete o da região, permitindo que os animais fossem infestados por carrapatos. As pesagens foram realizadas no primeiro dia do experimento (d0) e no último dia do experimento (d180). A sorologia revelou que 100% dos animais vacinados apresentaram títulos maiores ou iguais a 1:5120 para os três parasitos *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* ( $p \leq 0,025$ ) enquanto que no grupo controle os títulos máximos foram 1:2560 em quatro animais para *A. marginale*, 1:1280 em quatro animais para *B. bovis* e 1:1280 em dois animais para *B. bigemina*. Houve diferença significativa entre os dois grupos ( $p \leq 0,025$ ). O grupo I obteve 30,5 Kg a mais de ganho médio de peso que o grupo controle no final do experimento ( $p \leq 0,025$ ). Com os resultados obtidos, conclui-se que é mais eficiente, seguro e vantajoso econômica e tecnicamente manter os animais livres de carrapatos, desde o nascimento até o desmame, e vacinados contra tristeza bovina, do que com o manejo tradicional – “carrapateamento”.

**Palavras chaves:** *Babesia bovis*. *Babesia bigemina*. *Anaplasma marginale*. *Anaplasma centrale*. Tristeza bovina. Vacina. Carrapato. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Anticorpos. Imunofluorescência. Desmame. Peso.

## ABSTRACT

ARTECHE, Álvaro Carlos Menezes. **Evaluation of performance and levels of serological protection in calves vaccinated against tick fever (TF) compared to naturally tick infested calves.** 2011. 79f. Dissertation (Master Program in Veterinary Parasitology – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

This study analyzed, by reaction to indirect immunofluorescence and individual weighting, the levels of protection and weight-gain in beef calves from birth to the age of eight month, which received two doses of vaccine against tick fever and were maintained free from ticks, compared to naturally infested calves in extensive management conditions with continuous grazing in a rural property situated in the municipality of Santana do Livramento – Espinilho / RS. Two groups were randomly gathered, n=30, from which Group I (test) was kept free from ticks from birth to weaning and received two doses of the attenuated, trivalent, refrigerated vaccine against tick fever. Groupe II (control) followed the property's traditional management, which reflects the one used in the region, allowing the tick infestation by the animals. Weight control was accomplished in the first day (d0) and in the last day of the experiment (d180). The serology revealed that 100% of the vaccinated animals presented titles equal to 1:5120 for the three parasites *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* ( $p \leq 0,025$ ), whereas in the control group the highest titles were 1:2560 in four animals for *A. marginale*, 1:1280 in four animals for *B. bovis* and 1:1280 in two animals for *B. bigemina* ( $p \leq 0,025$ ). Group I got a mean weight-gain of 30,5 kg more than the control group at the end of the experiment ( $p \leq 0,025$ ). The results obtained show that keeping animals free from tick, from birth to weaning, and maintaining them vaccinated against tick fever is safer, more efficient and economically and technically more advantageous than the traditional management system – “carrapateamento” (natural tick infestation).

**Key words:** *Babesia bovis*. *Babesia bigemina*. *Anaplasma marginale*. *Anaplasma centrale*. Tick fever. Vaccine. Tick. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Antibody. Immunofluorescence. Weaning. Weight.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1 – Hemácias parasitadas por <i>A. marginale</i> .....                                                                            | 19 |
| FIGURA 2 – Hemácias parasitadas por <i>B. bovis</i> .....                                                                                | 20 |
| FIGURA 3 – Hemácias parasitadas por <i>B. bigemina</i> .....                                                                             | 21 |
| FIGURA 4 – Capilares cerebrais com <i>B. bovis</i> .....                                                                                 | 29 |
| FIGURA 5 – Síntese do cronograma do experimento .....                                                                                    | 45 |
| FIGURA 6 – Reação positiva de RIFI.....                                                                                                  | 48 |
| FIGURA 7 – Pesos médios no início e final do experimento .....                                                                           | 52 |
| FIGURA 8 – Porcentagem de bovinos soropositivos no início do experimento nos grupos I (vacinado) e II (controle).....                    | 54 |
| FIGURA 9 – Porcentagem de bovinos soropositivos ao final do experimento nos grupos I (vacinado) e II (controle).....                     | 56 |
| FIGURA 10 – Porcentagem de bovinos com titulação superior a 1:640 no início do experimento.....                                          | 57 |
| FIGURA 11 – Porcentagem de bovinos com titulação igual ou superior a 1:640 no final do experimento .....                                 | 58 |
| FIGURA 12 – Porcentagem de animais com titulação superior a 1:640 no início e final do experimento no grupo controle (carrapateado)..... | 58 |
| FIGURA 13 – Porcentagem de animais com titulação superior a 1:640 no início e final do experimento no grupo vacinado (teste).....        | 59 |
| FIGURA 14 – Ganhos médios de peso, por agente, ao final do experimento .....                                                             | 62 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1 – Quadro comparativo entre premunição e vacinação .....                                                                                                                                                    | 36 |
| TABELA 2 – Análise descritiva dos dados referentes a peso corporal e hematócrito dos animais dos grupos controle (GII) e vacinado (GI) ao final do experimento .....                                                | 52 |
| TABELA 3 – Distribuição das titulações por RIFI para <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i> em bovinos vacinados contra TPB (duas doses) e naturalmente infectados (controle), ao desmame ..... | 60 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ATC** - Anticoagulante  
**BVD** – Diarréia viral bovina  
**EDTA** – Ácido Etilenodiaminotetracético  
**ELISA** - Ensaio imuno enzimático  
**FC** – Fragmento cristalizável da imunoglobulina  
**g** – Grama  
**GI** – Grupo um  
**GII** – Grupo dois  
**GMF** – Ganho médio final  
**IBR** – Rinotraqueíte infecciosa bovina  
**IFN** - Interferon  
**IgG** - Imunoglobulina G  
**IgM** - Imunoglobulina M  
**Kg** – Quilograma  
**m** – Metro  
**mg** – Miligrama  
**NK** - Células matadoras naturais  
**°C** – Graus Celsius  
**PBS** - Tampão Fosfato-Salino  
**PMF** – Peso médio final  
**PMI** – Peso médio inicial  
**RIFI** - Reação de Imunofluorescência Indireta  
**RPM** – Rotações por minuto  
**RS** - Rio Grande do Sul  
**SMF** – Sistema monocítico fagocitário  
**TPB** -Tristeza Parasitária Bovina  
**UFPeI** - Universidade Federal de Pelotas  
**VG** – Volume globular  
**μ** – Micron  
**μl** – Microlitro  
**μm** – Micrômetro

## SUMÁRIO

|                                            |           |
|--------------------------------------------|-----------|
| <b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>                 | <b>15</b> |
| <b>2 – REVISÃO DE LITERATURA.....</b>      | <b>18</b> |
| 2.1 – Definição e etiologia.....           | 18        |
| 2.2 – Ciclo biológico.....                 | 21        |
| 2.3 – Transmissão.....                     | 23        |
| 2.4 – Patogenia.....                       | 24        |
| 2.5 – Epidemiologia.....                   | 26        |
| 2.6 – Sinais clínicos.....                 | 27        |
| 2.7 – Resposta imune.....                  | 29        |
| 2.8 – Importância e impacto econômico..... | 32        |
| 2.9 – Controle.....                        | 34        |
| 2.10 – Tratamento.....                     | 37        |
| 2.11 – Diagnóstico.....                    | 37        |
| 2.11.1 – Diagnóstico direto.....           | 38        |
| 2.11.2 – Diagnóstico indireto.....         | 38        |
| 2.11.3 – Diagnóstico molecular.....        | 40        |
| 2.12 – Vacinas.....                        | 40        |
| <b>3 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>         | <b>43</b> |

|                                                                 |            |
|-----------------------------------------------------------------|------------|
| 3.1 – Locais de execução do experimento.....                    | 43         |
| 3.2 – Animais experimentais.....                                | 44         |
| 3.3 – Formação dos grupos.....                                  | 44         |
| 3.4 – Tratamentos carrapaticidas e mosquicidas.....             | 44         |
| 3.5 – Vacinação contra Tristeza Parasitária Bovina.....         | 46         |
| 3.6 – Controle das reações vacinais.....                        | 46         |
| 3.7 – Pesagens.....                                             | 46         |
| 3.8 – Amostras de sangue.....                                   | 46         |
| 3.9 – Análise sorológica.....                                   | 47         |
| 3.10 – Determinação do hematócrito e esfregaços em lâminas..... | 49         |
| 3.11 – Custos com tratamentos.....                              | 49         |
| 3.12 – Análise estatística.....                                 | 50         |
| <br>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                             | <br>51     |
| 4.1 – Ganho de peso.....                                        | 51         |
| 4.2 – Hematócrito e exame direto.....                           | 53         |
| 4.3 – Sorologia.....                                            | 54         |
| 4.4 – Custo X benefício.....                                    | 60         |
| <br>5 – CONCLUSÕES.....                                         | <br>63     |
| <br>6 – REFERÊNCIAS .....                                       | <br>64     |
| <br><br>ANEXO.....                                              | <br><br>78 |

## INTRODUÇÃO

A tristeza parasitária bovina é um conjunto de três doenças que causam distúrbios hematológicos em bovinos de todas as idades. Os agentes dessas enfermidades são: *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. Esses hemoparasitos são transmitidos aos bovinos pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887).

Na América do Sul a babesiose é transmitida exclusivamente pelo carrapato, sendo um dos problemas sanitários de maior impacto econômico para a bovinocultura devido aos altos índices de morbidade e mortalidade. Além dos custos para combater esses parasitos, existem as perdas produtivas, pois os animais apresentam diminuição na produção de leite e carne e problemas reprodutivos, como aborto e diminuição da fertilidade (MARTINS, 2005).

O Rio Grande do Sul é considerado como área de instabilidade enzoótica, devido às estações climáticas serem bem definidas, e as baixas temperaturas não favorecerem o ciclo de vida livre do vetor (GONZALES, 2003). Segundo Farias (1995), são locais onde ocorre uma estação fria bem definida, fazendo com que os bovinos permaneçam longos períodos sem contato com o carrapato e com os agentes por eles transmitidos (*Babesia* spp.). Isso leva a uma queda nos níveis de anticorpos e, assim, nas estações mais quentes do ano ocorrem surtos de babesiose. As condições climáticas levam a flutuações da população de carrapato, sendo o verão e outono mais favoráveis e o inverno e a primavera desfavoráveis.

Nas áreas de instabilidade enzoótica, cada bovino pode apresentar infestação de dois a 10 carrapatos/dia, com taxa de inoculação (equação que define a probabilidade diária que um animal de determinada propriedade tem de ser infectado após seu nascimento) inferior a 0,005 e alta probabilidade de ocorrer a primo-infecção após os nove meses de idade (Mahoney & Ross, 1972). A instabilidade pode ser agravada pelo homem, ao tomar medidas que levem os bovinos a permanecerem longos períodos sem carrapatos, pelo uso excessivo de acaricidas, utilização de restegas para pastoreio, entre outros (Vanzini & Ramirez, 1995).

Nestas áreas são freqüentes os surtos da doença, sendo preciso estar atento ao problema para se fazer o diagnóstico e tratamento imediatos e corretos a fim de evitar ou minimizar as perdas. Entretanto, mais importante que controlar os surtos é adotar medidas que visem à prevenção da doença.

Para ações neste sentido, é imprescindível que se tenha o diagnóstico epidemiológico do problema na região e mais especificamente, na propriedade (SACCO, 2002). Esse diagnóstico epidemiológico é baseado no conhecimento do clima, manejo da propriedade, animais e pastagens, intensidade e a freqüência da presença do carrapato vetor, raça dos animais, e principalmente, a presença de bovinos portadores sadios no rebanho (SACCO, 2002).

O diagnóstico tem sido feito ao longo dos anos com a determinação da presença e a intensidade de anticorpos anti-*Babesias* e anti-*Anaplasma marginale* no soro dos bovinos através de técnicas de imunodiagnóstico como, por exemplo, a técnica da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) utilizada, por muitos anos e ainda hoje, como ferramenta importante.

No Brasil, o uso de vacinas vivas, congeladas e atenuadas foi apresentado por Kessler *et al* (1991) com resultados satisfatórios em termos de proteção contra os três agentes da tristeza bovina. Arteche (1992), como resultado de estudos feitos desde 1979, apresentou ao mercado brasileiro uma vacina trivalente, atenuada e refrigerada, pronta para aplicação, contra os agentes da tristeza bovina, sendo a primeira vacina do Brasil a ser produzida em escala industrial e disponível comercialmente desde 1990. Atualmente é a única vacina disponível no mercado com registro e licença do Ministério da Agricultura.

Os objetivos do presente trabalho foram determinar o nível de proteção sorológica e o ganho de peso de terneiros vacinados contra a tristeza bovina

mantidos livres de carrapatos desde o nascimento até o desmame com oito meses de idade e comparar ao manejo tradicional que permite a infestação dos animais por carrapatos como forma de imunização contra os agentes da tristeza bovina.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Definição e Etiologia

Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é nome comum das doenças causadas por protozoários do gênero *Babesia* e bactéria do gênero *Anaplasma* que se manifesta, clinicamente, por febre, anemia, hemoglobinúria, icterícia, anorexia, emaciação e alta mortalidade entre bovinos sensíveis (KESSLER & SCHENK, 1998).

Anaplasmosose é uma doença infectocontagiosa que atinge os bovinos, ovinos e caprinos, sendo causada por um patógeno bacteriano do gênero *Anaplasma* (THEILER, 1910) e caracterizada essencialmente por uma anemia acentuada e progressiva. *Anaplasma* spp estão genética e antigenicamente, vinculados a família Ehrlichiae, particularmente *Ehrlichia phagocytophila*, *E. platys* e *E. bovis* dentro da ordem Rickettsiales. A unificação taxonômica deste grupo de patógenos dentro do gênero *Anaplasma* provavelmente será adotada num futuro próximo (PALMER & LINCOLN, 2002). Como presentemente classificada, as duas primeiras espécies patogênicas de anaplasma são *Anaplasma marginale* e *Anaplasma ovis*. Ambas as espécies infectam eritrócitos maduros nos hospedeiros ruminantes, sendo a doença normalmente manifestada por *A. marginale* em bovinos e *A. ovis* em ovinos e caprinos. Historicamente, uma terceira espécie, *Anaplasma centrale*, tem sido descrita causando uma doença leve em bovinos e, como consequência, tem sido usada como vacina viva para induzir proteção contra *Anaplasma marginale*.

O microorganismo, *Anaplasma marginale*, é um corpo esférico diminuto, com 0,3 a 0,8 µm de diâmetro, e se localiza no interior do citoplasma dos eritrócitos, nas proximidades da periferia da célula (Fig. 1). Com os corantes do tipo Romanowsky, como o Giemsa, esse microorganismo fica evidenciado como estruturas redondas, homogêneas, densas, de cor púrpura – azulada. Através da microscopia eletrônica, essas estruturas aparecem separadas do citoplasma do eritrócito por uma membrana, apresentando entre uma e oito subunidades, ou corpos iniciais, que são as unidades parasitárias (JONES *et al*, 1997)

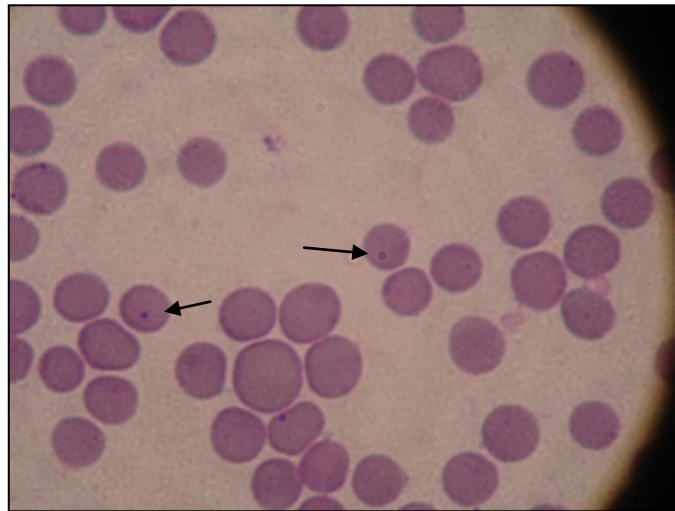


Figura 1 - Hemácias parasitadas por *Anaplasma marginale*.  
Aumento 1000X.  
Fonte: Arteche, 2008.

Os protozoários do gênero *Babesia* são parasitos intraeritrocíticos que pertencem à família Babesiidae, ordem Piroplasmorida, classe Aconoidasida e filo Apicomplexa, com 111 espécies descritas parasitando animais domésticos, silvestres, de laboratório e o próprio homem (LEVINE, 1988).

Segundo Kuttler (1988), *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* são as espécies de maior importância econômica, ocorrendo em países localizados entre os paralelos 32°N e 32°S, seguindo a distribuição do principal vetor, o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887).

O parasito *Babesia bovis* foi descrito por Babès em 1888, na Romênia, como agente de uma doença endêmica em bovinos que cursava com febre, prostração, anemia, icterícia, sintomatologia nervosa e, freqüentemente, morte. Como detectou

formas arredondadas e brilhantes no interior das hemácias, julgou tratar-se de uma bactéria e denominou *Haematococcus bovis*. Posteriormente, em 1893, Starcovici propôs o nome *Babesia bovis* (Fig. 2).

Nos Estados Unidos, Smith & Killborne (1893) descreveram, pela primeira vez, a transmissão de um protozoário ao seu hospedeiro mamífero, por um vetor artrópode. Os pesquisadores identificaram um microorganismo intra-eritrocitário como agente da enfermidade “Texas Fever”, com altos índices de mortalidade nos rebanhos bovinos, que foi denominado *Pyroplasma bigeminum* (Sin. *Babesia bigemina*) e descreveram sua transmissão pelo carrapato *Boophilus annulatus*.



Figura 2 - Hemácias parasitadas por *B. bovis*. Aumento 1000x.  
Fonte: Arteche, 2008.

*Babesia bovis* (sinonímia: *B. argentina* e *B. berbera*) apresenta forma redonda (1 a 2,5µm) ou piriforme (2 a 2,5µm), podendo suas formas unidas orientarem-se em posições variadas dentro dos eritrócitos (SOLORIO-RIVERA e RODRÍGUEZ-VIVAS, 1997b). *Babesia bigemina* (Fig. 3), é mais larga e irregular e necessita ficar em ângulo agudo no interior da célula (MAHONEY, 1973), a forma piriforme mede em torno de 3 a 4µm de extensão por 0,8 a 1,2µm de largura (SOLORIO-RIVERA e RODRÍGUEZ-VIVAS, 1997a).

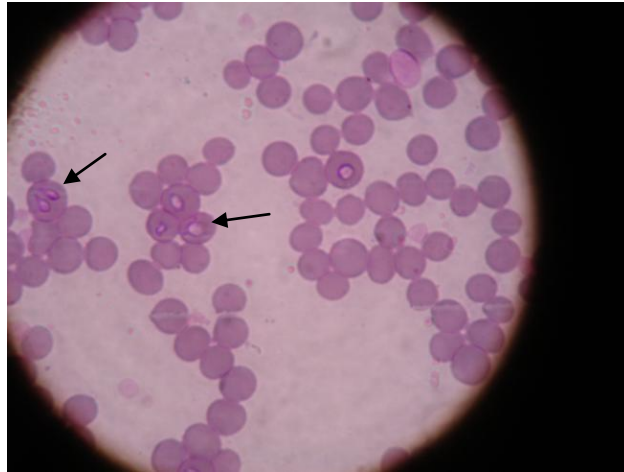


Figura 3 - Hemácias parasitadas por *B. bigemina*. Aumento 1000x  
Fonte: Arteche, 2008.

No Brasil esses parasitos foram descritos pela primeira vez por Fajardo (1901), e foram posteriormente citados por Fonseca & Braga (1923) como agentes da “Tristeza Parasitária Bovina”, que inclui babesiose e anaplasmoses. Os autores relataram que a doença ocorria em todo o país, causando sérias perdas econômicas.

## 2.2 Ciclo Biológico

O ciclo de *Anaplasma*, no bovino, inicia-se com a penetração dos corpos iniciais nos eritrócitos pelo processo de rofecitose, que envolve invaginação da membrana citoplasmática formando o vacúolo parasitóforo. No interior do vacúolo os corpos iniciais multiplicam-se por divisão binária, originando até oito corpos. Os corpos iniciais saem dos eritrócitos por um processo de rofecitose reversa, sem romper a membrana da hemácia, e iniciam novo ciclo ao penetrar em novos eritrócitos (RIBEIRO & PASSOS, 2002)..

Como o organismo é raramente observado extracelularmente, tem-se postulado que a transmissão dos corpos iniciais possa ocorrer também através de pontes intercelulares entre eritrócitos (RIBEIRO & PASSOS, 2002).

Segundo Young e Morzaria (1986) e Friedhoff (1988), o ciclo das babesias se desenvolve da seguinte forma: a infecção do hospedeiro invertebrado ocorre quando este ingere eritrócitos infectados com gametócitos. No estômago deixam os eritrócitos e atingem a luz do intestino. Diferenciam-se em corpos raiados, considerados gametas iniciando a gametogonia. Após dois a quatro dias, os

gametas feminino e masculino se fundem e formam uma célula esférica chamada zigoto, que se transforma em uma célula chamada cineto primário ou oocineto. O início da esporogonia ocorre quando o oocineto invade as células epiteliais basófilas do intestino e inicia as divisões assexuadas, formando mais cinetos, que são liberados das células intestinais para a hemolinfa, invadindo os hemócitos e outros órgãos, até mesmo os ovários e oócitos (FRIEDHOFF, 1988).

Nestas células o processo de divisão assexuada continua, produzindo os esporocinetos que invadem novas células e seguem se multiplicando durante o período de pré-postura e postura, até a teleógina morrer. Quando as larvas se fixam no hospedeiro vertebrado, ocorre novamente a esporogonia e os esporocinetos invadem as glândulas salivares sofrendo uma outra forma de reprodução assexuada, formando esporozoítos, sendo estes as formas infectantes para o bovino (FRIEDHOFF, 1988).

No hospedeiro vertebrado ocorre a merogonia: os esporozoítos inoculados, junto com a saliva, no momento que o vetor suga o sangue do hospedeiro vertebrado, penetram nas hemácias e transformam-se em trofozoítos, sofrem divisão formando duas células chamadas de merozoítos (merogonia), que rompem as hemácias ao saírem. Os merozoítos invadem novas hemácias pelo seguinte processo: o merozoíto entra em contato com um novo eritrócito e segue a orientação do pólo apical deste merozoíto com a superfície do eritrócito, ocorrendo então a fusão das membranas e a liberação do conteúdo das roptrias do merozoíto e após a invaginação das membranas do eritrócito o merozoíto está dentro da célula. O merozoíto fica em um vacúolo parasitóforo e se diferencia em trofozoíto, rompe o vacúolo, ficando em contato direto com o citoplasma da hemácia. O trofozoíto apresenta uma única membrana, que permite o contato direto com o citoplasma da hemácia e por difusão e osmose, alimenta-se de substâncias do citoplasma (FARIAS, 1995). A divisão do trofozoíto ocorre por brotamento ou fissão binária, formando novamente as paredes internas e o complexo apical, originando novos merozoítos ou gametócitos. Os merozoítos estão prontos para deixarem as hemácias, e ao saírem, provocam ruptura da célula vermelha (FARIAS, 1995). O carrapato, ao se alimentar no bovino, ingere os eritrócitos contendo os parasitos, e a partir dos gametócitos, há o recomeço do ciclo.

## 2.3 Transmissão

A transmissão biológica de *A. marginale* por várias espécies de ixodídeos tem sido demonstrada experimentalmente (STILLER & COAN, 1995). Kocan *et al* (1989) descreveram o ciclo evolutivo em *Dermacentor spp.* O desenvolvimento de colônias de *A. marginale* no intestino de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* foi comprovado por Ribeiro e Lima (1996).

Apesar de já ter sido demonstrada a transmissão transovariana no carrapato, este meio não parece ocorrer com frequência (CONNEL & HALL, 1972), diferentemente do que ocorre com a babesiose.

Estes artrópodes podem ter importância pelo mecanismo de transmissão denominado transestadial ou interestadial, ou seja, os carrapatos podem adquirir os corpúsculos iniciais, em qualquer estágio parasitário (larvas, ninfas ou adultos) assim como pode ocorrer a transmissão para o estágio seguinte (AGUIRRE *et al*, 1994). Uma vez infectados, estes carrapatos na fase adulta podem se destacar de um bovino e infestarem outro, levando assim, consigo, a infecção para este outro animal, sendo esta transmissão chamada de intraestadial (SAMISH *et al*, 1993). Os machos do *R. (B). microplus*, devido às suas características de maior mobilidade e maior longevidade, podem adquirir importância nesse método de transmissão da anaplasmoze.

A transmissão iatrogênica/mecânica deve ser considerada, podendo ocorrer surtos de anaplasmoze após castrações, vacinações ou qualquer outra situação em que o rebanho seja submetido ao emprego de materiais sem a devida desinfecção e esterilização, ao serem usados entre um e outro animal (EWING, 1981; BARBET, 1995; RICHEY, 1999;).

A transmissão transplacentária tem sido descrita com certa frequência (PASSOS & LIMA, 1984; RIBEIRO *et al*, 1995), na maioria dos casos os fetos foram infectados quando a vaca havia sido infectada durante o período de gestação, entretanto seu significado com relação a epidemiologia da anaplasmoze, merece ser melhor estudada (KESSLER, 2001).

A transmissão mecânica por insetos hematófagos, especialmente envolvendo tabanídeos, mosca dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*) e mosca dos chifres (*Haematobia irritans*), é importante e também deve ser considerada (POTGIETER *et al*, 1981; FOIL, 1989; BARBET, 1995; RICHEY, 1999).

A transmissão de *B. bovis* e *B. bigemina* ocorre em diferentes estágios de vida do carrapato (MAHONEY e ROSS, 1972). *B. bigemina* é transmitida por ninfas e adultos (machos e fêmeas). Caso a infecção se torne patente no bovino haverá a reinfecção destes carrapatos pela alimentação das teleóginas (infecção alimentar). As teleóginas também poderão manter a infecção para a próxima geração de carrapatos caracterizando uma transmissão ou infecção vertical.

Segundo Friedhoff & Smith (1981) e Friedhoff (1988), o protozoário *B. bovis* é transmitido exclusivamente por larvas, e isso ocorre por estarem localizadas no tecido glandular, que sofre histólise total durante a muda para ninfa, levando estas a perderem a capacidade de infecção após ter ocorrido à transmissão. As teleóginas não possuem formas capazes de infectar seus ovos, apenas se o ingurgitamento destas teleóginas ocorrer em um hospedeiro infectado. Desta forma, a infecção da população de carrapatos é baseada somente na infecção alimentar da fêmea ingurgitada em hospedeiro infectado.

## 2.4 Patogenia

A patogenia de *A. marginale* está relacionada ao processo de anemia. Entretanto, a intensidade da anemia não apresenta correlação com o grau de parasitemia, mas sim com a produção de anticorpos contra a membrana de hemácias parasitadas e não parasitadas, constituindo-se, portanto em doença auto-imune (RIBEIRO & PASSOS, 2002).

Segundo Ribeiro & Passos (2002) no início da infecção há remoção apenas dos eritrócitos infectados que apresentam alterações celulares, como redução da concentração de fosfolipídios e aumento de ácido siálico. Posteriormente aparecem os auto-anticorpos que aderem às hemácias parasitadas e não parasitadas, aumentando a eritrofagocitose pelos macrófagos do sistema monocítico-fagocitário (SMF), principalmente no baço. Nessa fase, ocorre redução acentuada do volume globular (VG), havendo correlação entre títulos de auto-anticorpos e grau de anemia. Esse fato explica a ocorrência de redução do volume globular uma semana após o pique de parasitemia. Como a destruição dos eritrócitos ocorre no SMF, não há hemoglobinemia ou hemoglobinúria em animais com anaplasmoses. Os pigmentos liberados da destruição dos eritrócitos são excretados como urobilinogênio.

Segundo Farias (1998) as lesões microscópicas são comuns a várias enfermidades nas quais ocorre hemólise intravascular e anemia.

A morte de animais na anaplasmosse aguda geralmente está associada com a severidade da anemia, redução de potássio plasmático e acidose metabólica.

A patogenia de *Babesia* sp. depende de fatores ligados ao hospedeiro e ao parasita. Os animais com menos de um ano de idade são mais resistentes que os adultos, devido à maior capacidade do sistema hematopoiético para a reposição de hemácias, e à presença de resquícios da hemoglobina fetal que inibem a multiplicação do parasito (LEVY *et al.*, 1982). Além disso, recebem a proteção de anticorpos colostrais, durante os primeiros meses de vida.

Os zebuínos (*Bos indicus*), além de serem mais resistentes ao carrapato, são menos sensíveis a babesiose, sobretudo por *Babesia bovis*, do que os animais de raças taurinas (*Bos taurus*) (LITTLE, 1964; FRANCIS, 1966; JOHNSTON *et al.*, 1978). Outros fatores, como o estado nutricional do animal e situações de estresse que podem levar a imunodepressão, também têm grande importância na determinação da maior ou menor gravidade de um quadro de babesiose bovina.

Quanto aos fatores ligados ao agente, existem diferenças entre as espécies, sendo as pequenas babesias mais virulentas do que as grandes babesias (WRIGHT & GOODGER, 1988). Assim, *Babesia bovis* é mais patogênica que *Babesia bigemina* principalmente devido à ativação de substâncias farmacologicamente ativas, causando lesões no Sistema Nervoso Central (WRIGHT, 1972). Além disso, dentro de uma mesma espécie existem cepas mais patogênicas do que outras e, geralmente, quanto maior for o inóculo, mais grave será a doença (PURNELL *et al.*, 1977).

O principal efeito patogênico de *Babesia bigemina* é a hemólise causada pela saída dos parasitos, sendo agravada pelo aumento de fragilidade da membrana, que leva à ruptura mesmo de células não parasitadas (WRIGHT, 1981).

A patogenicidade de *Babesia bovis*, diferentemente, é devida principalmente à ativação de substâncias farmacologicamente ativas, por metabólitos do parasita. O complexo caliceína-cinina, uma vez ativado, leva a um rápido choque vasodilatador hipotensivo (WRIGHT *et al.*, 1988). Também são ativados fatores de coagulação, levando à formação de trombos, o que agrava o quadro de anóxia. Segundo WRIGHT & GOODGER (1988), a anóxia é agravada pela estase sangüínea no sistema microvascular e pelo acúmulo de hemácias parasitadas que se aderem umas às outras e ao endotélio de capilares. Essa agregação celular é devida a

vasodilatação hipotensiva, além de alterações na composição e concentração de lipídios, vitamina E e ácido siálico na membrana das hemácias, o que altera sua flexibilidade, tornando-as rígidas e contribuindo para sua agregação (COMMINS *et al.*, 1988).

Em ambos os casos, podem ocorrer diferentes graus de anóxia de órgãos vitais, sendo mais atingidos aqueles de maior atividade metabólica, como o fígado, os rins e o cérebro. A anóxia inicia pela estase sangüínea e é agravada pela anemia (WRIGHT *et al.*, 1979).

O quadro infectivo depende da virulência do parasito, do inóculo e do nível de resistência do hospedeiro. A infecção subclínica caracteriza-se pela sobrevivência do agente no hospedeiro, sem causar doença. Esse estado é mantido por um delicado equilíbrio entre o nível imunológico do hospedeiro e o protozoário. O desequilíbrio, que leva à infecção clínica, pode ser desencadeado por fatores como fome, transporte, outras enfermidades ou esplenectomia (MAHONEY, 1977).

## **2.5 Epidemiologia**

A anaplasmosse é mundialmente a mais prevalente das doenças transmitidas pelos artrópodes e resulta em serias restrições à produção de bovinos em regiões tropicais e subtropicais (KOCAN *et al.*, 2009). Em regiões temperadas também é um problema significativo.

Regiões endêmicas refletem alta infestação de carrapatos e insetos e são mantidas pela prevalência da infecção nos hospedeiros portadores e nos artrópodes transmissores, os quais são constantemente infectados. Estes bovinos portadores, como são tipicamente assintomáticos, são eficientes reservatórios para a transmissão da doença. Por outro lado, ruminantes selvagens raramente manifestam a doença e geralmente são portadores assintomáticos com importância na epidemiologia ainda não devidamente esclarecida (PALMER & LINCOLN, 2002).

A anaplasmosse, juntamente com a babesiose, é considerada como uma das mais importantes doenças tropicais e está restrita entre os paralelos 32° norte e 32° sul, e a altitudes inferiores a 1200m. Estas condições estão relacionadas com as condições epidemiológicas favoráveis ao artrópode vetor. A temperatura ambiente é um fator preponderante para o desenvolvimento do carrapato e, conseqüentemente, para a situação epidemiológica dessas doenças (KOCAN *et al.*, 2009).

No Brasil, essas hemoparasitoses são endêmicas na maior parte do território onde se criam bovinos. Na região Sul, encontra-se áreas livres, no extremo sul do estado do Rio Grande do Sul, sendo que áreas de instabilidade endêmica são encontradas na fronteira do Rio Grande do Sul com o Uruguai e no planalto do Estado do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. No Nordeste, devido à seca, criam-se áreas de instabilidade no sertão da Bahia, Pernambuco e Ceará. Nas demais áreas, devido às condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento dos artrópodes vetores, durante todo o ano, a situação é de estabilidade endêmica. Esta estabilidade, porém, pode ser quebrada por programas de controle intensivo dos vetores (KESSLER & SCHENK, 1998).

Assim, no Brasil têm-se três situações epidemiológicas distintas: situação livre, onde as condições climáticas, na maior parte do ano, não são favoráveis ao desenvolvimento dos artrópodes vetores; situação de instabilidade enzoótica, em que o carrapato interrompe seu ciclo por um período de 2 a 3 meses, devido a condições desfavoráveis e situação de estabilidade enzoótica, em que as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento dos vetores durante todo o ano (KESSLER & SCHENK, 1998).

Segundo Mahoney (1962), Mahoney e Ross (1972), Friedhoff e Smith (1981), a prevalência sorológica de infecção aos nove meses de idade é a base para descrever um modelo epidemiológico clássico determinando três situações básicas: até 12% de animais positivos, os surtos são pouco prováveis, mas se ocorrer haverá grande prejuízo; de 12 a 80% de animais positivos, é uma situação de máximo risco, considerada como instabilidade enzoótica; e acima de 80% de animais positivos, existe pouca probabilidade de ocorrência de surtos, considerada como área de estabilidade enzoótica.

## **2.6 Sinais Clínicos**

Os sinais da anaplasmosose são amplamente variados desde uma doença aguda até uma infecção subclínica, refletindo a virulência da cepa do patógeno, idade e raça do hospedeiro susceptível. O período de incubação varia de 21 a 45 dias, com uma média de 30 dias. A doença é muitas vezes leve em terneiros com idade entre 6-9 meses e cada vez mais severa em animais mais velhos. Infecção em terneiros jovens freqüentemente é assintomática e, ocasionalmente, pode ser observada letargia leve e anorexia parcial por 24-48 horas. Em contraste, os

estágios iniciais de anaplasmosse em bovinos adultos são caracterizados por febre, com temperatura retal variando de 39,5 a 41°C, sendo que em 12 a 24 horas a mesma pode ceder, caindo para normal e haver hipotermia antes de o animal morrer. Também pode ser observada anorexia e, em vacas leiteiras, decréscimo acentuado na produção de leite, após a detecção de febre. Ao mesmo tempo, ocorre supressão de ruminação, focinho seco e certo grau de letargia (PALMER & LINCOLN, 2002).

Alguns bovinos podem ficar agressivos, possivelmente como resultados de hipóxia cerebral associado com anemia (RISTIC, 1977). Cuidados devem ser tomados para não se manejar excessivamente bovinos severamente anêmicos, pois pode resultar em colapso circulatório e morte. Bovinos que andam cambaleando normalmente estão anêmicos e com hipóxia tecidual. As mucosas inicialmente são pálidas, mas podem ficar ictéricas se o animal sobreviver 2-3 dias após a crise aguda. A constipação é um sinal consistente, sendo que as fezes podem se mostrar com coloração marrom escura e com muco. Também, a polaquiúria é caracterizada por urina amarela escura. Hemoglobinúria não ocorre em anaplasmosse, diferentemente de babesiose. No período final da gestação pode ocorrer aborto, muito provavelmente em função da elevação de temperatura.

Há grande variação nos sinais clínicos das babesioses devido à diferença de patogenicidade entre as espécies e mesmo entre cepas da mesma espécie. A susceptibilidade do hospedeiro pode estar alterada pela idade, raça e anticorpos colostrais (MAHONEY et al., 1979). Benavides e Sacco (2007) citam que as características genéticas também provocam variações nos sinais clínicos, sendo que dentro de um grupo homogêneo de animais desafiados com *B. bovis* foram constatados três diferentes fenótipos: animais suscetíveis, intermediários e resistentes. As respostas individuais irão ocasionar maior ou menor intensidade aos sinais clínicos característicos da doença.

A infecção clínica, caracterizada por uma grande multiplicação dos parasitos, apresenta, segundo Purnell (1981), sinais clínicos como hipertemia (40 a 42°C), anorexia, taquicardia, taquipnéia, redução da ruminação, mucosas pálidas, discreta ictéria, hemoglobinúria (mais intensa se o agente for *Babesia bigemina* devido à intensa hemólise intravascular), abatimento e prostração devido à anóxia, redução da lactação e aborto, devidos à hipertemia intensa e à anóxia, incoordenação

motora, andar cambaleante, movimentos de pedalar e agressividade, característicos da infecção por *Babesia bovis* devido à anóxia cerebral.

Tem sido observado que na infecção por *B. bovis* em bovinos, ocorre seqüestro de eritrócitos parasitados nos capilares (Fig. 4) da substância cinzenta do encéfalo (CALLOW e McGAVIN, 1963; ROGERS, 1971; PATARROYO et al., 1982; SOLANO, 1986). Isso provoca eventos químicos e imunológicos que induzem manifestações clínicas distintas, caracterizadas por sinais neurológicos e conhecidas como babesiose cerebral (CALLOW e McGAVIN, 1963; RODRIGUES et al., 2005).

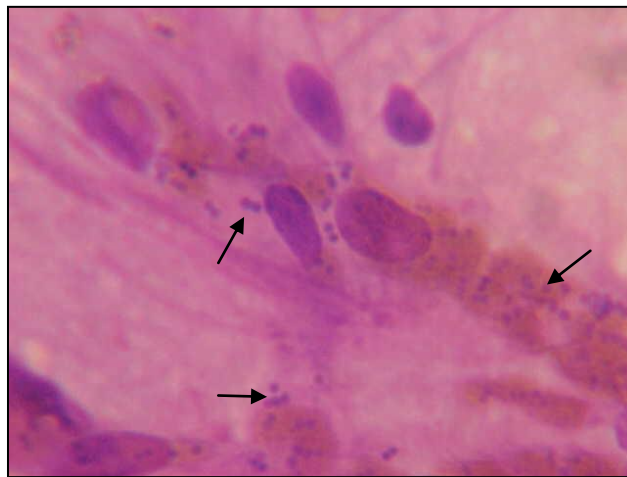


Figura 4 - Capilares cerebrais com *B. bovis*. Aumento 1000x  
Fonte: Monticelli, 2000.

## 2.7 Resposta Imune

A imunidade contra *A. marginale* requer mecanismos humorais e celulares. Anticorpos direcionados contra corpúsculos iniciais bloqueiam a infectividade da bactéria (PALMER & McGUIRE, 1984). Na membrana desses corpúsculos foram identificadas proteínas principais de superfície (Major Surface Proteins – MSPs) (PALMER & McGUIRE, 1984, TEBELE et al, 1991), as quais induzem a produção de anticorpos que estão relacionados com o controle da riquetsemia aguda e anemia (TEBELE et al, 1991). Possivelmente, anticorpos contra MSPs funcionam como opsoninas, facilitando a fagocitose e a eliminação de *A. marginale* por macrófagos. Outra possível função dos anticorpos seria o bloqueio da invasão de eritrócitos pela bactéria. Anticorpos contra MSP1 bloqueiam a aglutinação de eritrócitos de bovinos por corpúsculos iniciais de *A. marginale* (McGAREY & ALLRED, 1994).

Apesar da importância dos anticorpos na imunidade contra *A. marginale*, é pouco provável que, isoladamente, os mesmos sejam capazes de proteger os bovinos contra anaplasmoses (BROWN *et al.*, 2001b), uma vez que a inoculação do soro de animais imunes em bovinos susceptíveis não protege contra o desafio com *A. marginale* (GALE *et al.*, 1992). Dessa forma, evidencia-se a importância das respostas celulares, as quais envolvem a participação de linfócitos T auxiliares (CD4+), produtores de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (BROWN *et al.*, 1998a). Essa citocina ativa macrófagos, aumentando a produção de óxido nítrico (NO), substância que tem ação tóxica sobre riquetsias e bactérias, estimulando a expressão de receptores do fragmento cristalizável da imunoglobulina (Fc) e a fusão de fagossomos e lisossomos. Além disso, foi demonstrado que, em bovinos, o IFN- $\gamma$  atua sobre linfócitos B, estimulando a produção de IgG2 (ESTES *et al.*, 1994). Esse isotipo apresenta maior capacidade de promover fagocitose por meio de opsonização do que a IgG1, estando provavelmente envolvido no processo de neutralização da infectividade de corpúsculos iniciais de *A. marginale* mediada por anticorpos (TUO *et al.*, 2000).

Quanto às babesias, conforme Ulevitch *et al.* (2004), a imunidade inata é a primeira linha de defesa, formada por células fagocíticas, células matadoras naturais (NK) e citocinas, sendo uma resposta não específica. O sistema imune inato ativa as células via seus receptores que reconhecem os padrões moleculares encontrados em muitos diferentes microorganismos. Para que a defesa seja duradoura e eficaz é necessário o desenvolvimento da resposta imune adaptativa mediada por linfócitos T e B (BOCK *et al.*, 2004). Desta forma a imunidade inata é essencial para ignição da resposta imune adquirida por meio da ativação dos macrófagos e células NK e a produção de suas respectivas citocinas (MADRUGA *et al.*, 2001).

Segundo Brown e Palmer (1999), quando ocorre a primo-infecção, os macrófagos fagocitam os eritrócitos parasitados e merozoítos livres, processam e apresentam os antígenos de babesia para as células T CD4+ pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Este mecanismo é fundamental, pois os eritrócitos não possuem MHC, necessitando, portanto das células apresentadoras de antígenos, para que estas promovam o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida, (BROWN e PALMER, 1999; MACHADO *et al.*, 2004).

Stich *et al.* (1998), Goff *et al.* (2001) e Goff *et al.* (2002) relataram que o interferon-  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) secretado por macrófagos ativados frente a merozoítos de

babesia, representa um papel chave na resposta imune e supressão desse parasito, e as células NK também produzem IFN- $\gamma$  em resposta aos estímulos de IL-12 e IL-18. Os macrófagos ativados pelos eritrócitos parasitados produzem óxido nítrico e derivados, inibindo assim as atividades intracelulares, facilitando a fagocitose das células vermelhas parasitadas, e também atuando como células apresentadoras de antígenos em conjunto com linfócitos T auxiliares (Th) (STICH *et al.*, 1998; HOPE *et al.*, 2005). Isto resultará no controle da parasitemia e, portanto, superação da fase aguda da infecção (MADRUGA *et al.*, 2001). Segundo Allred e Al-Khedery (2004), o controle da infecção é mediado pela destruição de eritrócitos infectados por ativação de macrófagos esplênicos e a neutralização promovida pelos anticorpos direcionados contra merozoítos extracelulares e antígenos variáveis existentes na superfície de eritrócitos infectados por *B. bovis* definidos como VESA 1 (variant erythrocyte surface antigen-1). Esses mecanismos imunes são dependentes das células T CD4<sup>+</sup> (BROWN *et al.*, 2006a). Brown *et al.* (2006b) descrevem que bovinos sobreviventes a uma infecção inicial com *B. bovis*, naturalmente ou seguido de quimioterapia, ficam persistentemente infectados e resistentes à doença clínica. A imunidade relacionada à idade para infecção inicial com *B. bovis* está bem estabelecida, caracterizada pela forte imunidade inata em terneiros jovens (SHODA *et al.*, 2000; GOFF *et al.*, 2001). Terneiros resistem à infecção por *B. bovis* por expressar precocemente níveis mais altos de IL-12, IFN- $\gamma$  e óxido nítrico (ESTES & BROWN, 2002; BROWN, 2006a).

Brown *et al.* (2006b) descreveram que terneiros jovens são relativamente resistentes para desenvolver a forma severa da doença típica observada em adultos suscetíveis no início da infecção com *B. bovis*. Essa resistência relativa à idade não é unicamente devido ao efeito protetor dos anticorpos maternos, pois a duração da resistência excede àquela transferida passivamente por anticorpos e terneiros nascidos em regiões livres, quando infectados experimentalmente com o parasito, também se mostraram resistentes. De acordo com O'Donoghue *et al.* (1985), os níveis de anticorpos aumentam durante a fase aguda da infecção e depois declinam durante a fase crônica. Quanto à cinética da produção de anticorpos contra *B. bigemina*, os autores mostraram que a IgM é detectada sete dias após a inoculação desse hemoparasito, alcançando um pico no 12º dia e persistindo em um platô até o 22º dia, declinando até baixos níveis no 28º dia pós-inoculação.

A IgG também é detectada no sétimo dia pós-infecção, alcançando títulos mais altos no 12º dia e permanecendo, assim, por sete semanas. Os níveis de anticorpos anti-babesia caem, em média, quatro a cinco meses após a ausência do agente (FARIAS, 1995). A presença de títulos detectáveis de anticorpos não significa, necessariamente, imunidade protetora, entretanto é um indicador eficaz de infecção recente, quer naturalmente adquirida ou por vacinação (BOCK *et al.*, 2004).

## 2.8 Importância e Impacto Econômico

O carrapato *R. (B.) microplus* alimenta-se de sangue, e esta ação nefasta é a primeira e talvez a de menor importância, apesar de admitir que este processo espoliativo interfira no ganho de peso do animal. Além disso, a inoculação de toxinas na corrente circulatória do hospedeiro poderia interferir na síntese protéica, resultando numa desproporção proteína-gordura, com prevalência desta última, flagrada por ocasião do abate (GOMES, 1998).

Além das ações hematófaga e tóxica, o carrapato pode transmitir pelo menos dois gêneros de agentes infecciosos: *Anaplasma* e *Babesia*. O terceiro dano direto produzido pelo carrapato efetua-se na pele do animal resultando em grandes prejuízos e desvalorização de 40% no valor do couro para exportação e abastecimento interno. De cada três pares de calçados que saem do Brasil, mais de dois pares são fabricados com couro importado porque 70% dos couros produzidos no Brasil são de baixa qualidade devido à ação de carrapatos e bernes (GOMES, 1998).

Existem também os danos indiretos que são aqueles resultantes da mão-de-obra necessária para fazer o combate ao parasito, assim como as demais despesas com construções, manutenção de banheiro e uso de carrapaticidas. Portanto, pela complexidade da ação dos carrapatos sobre os bovinos e a pecuária mundial, os prejuízos exatos são difíceis de calcular, contudo, as perdas diretas e indiretas devido a esse parasito parecem ser salientadas (Gomes, 1998).

Na Austrália, Wharton & Roulston (1977) estimaram que os prejuízos causados pelo carrapato atingem 42 milhões de dólares ao ano. No México, Beltrán (1977) citou que o carrapato causa um prejuízo anual de aproximadamente 303,75 milhões de dólares na exploração leiteira. Para as áreas de sua ocorrência, calcula-se que cerca de 150 mil cabeças de gado morrem anualmente por doenças transmitidas por esses ectoparasitos, com prejuízo aproximado de 225 milhões de

dólares. Segundo este autor, o México deixa de produzir anualmente 550 milhões de quilogramas de carne, elevando os prejuízos para 3,05 bilhões de dólares.

Na Argentina, Torrado (1976) cita que os prejuízos em função do carrapato ocorridos no ano de 1972 foram de 90 milhões de dólares.

Horn & Arteché (1985) citam que as perdas causadas pelo carrapato no Uruguai são de 9,5 Kg de carne/bovino/ano. Na Nicarágua as estimativas mostram que uma vaca leiteira infestada com 50 carrapatos diminui a produção de leite em 20% e, para o Brasil, citam que os prejuízos produzidos pelo carrapato situam-se próximos a 800 milhões de dólares ao ano na pecuária nacional, e que, só no Rio Grande do Sul, foi calculado que o carrapato mata 136.084 bovinos por ano e 154.843 bezerros deixam de nascer.

Doenças hemoparasitárias são endêmicas na metade das áreas de produção de bovinos no mundo e constituem obstáculos para o incremento da produção de carne, leite, principalmente no Terceiro Mundo. A anaplasmosose ocorre por toda região tropical e subtropical e é responsável por 50 a 100 mil bovinos mortos anualmente nos Estados Unidos (PALMER *et al*, 1986). Nesse país, a “American National Cattlemen`s Association” tem considerado a anaplasmosose como a doença que causa maiores perdas econômicas com perdas estimadas por volta de 300 milhões de dólares anuais (BRINKMAN *et al.*,1990).

A importância econômica das babesioses no desenvolvimento da pecuária é determinada por muitos fatores, dentre os quais perdas por mortes, menor produção de carne e leite em animais doentes ou em recuperação, custos com quarentenas, tratamentos, manejos especiais, abortos e menor fertilidade temporária nos touros resultante da febre (LOMBARDO, 1976; McCOSKER,1981). Segundo estudos realizados no Brasil, Argentina e Uruguai, os produtores apontam os carrapatos e a Tristeza Parasitária Bovina (TPB) como dos maiores problemas sanitários dos rebanhos (MADRUGA *et al.*, 1986; SPÄTH, 1986), sendo que a babesiose provoca perdas de 23 a 45% no ganho de peso dos animais (SOLARI *et al.*, 1992). Um estudo mostrou que os fazendeiros da região sul do Brasil, em média, perdem seis animais por propriedade por ano como resultado das babesioses (SEBRAE/SENAR/FARSUL, 2005).

De acordo com Valerón (1998), cerca de 600 milhões de cabeças de bovinos estão expostos à *Babesia* spp e ao *Anaplasma marginale* nos países tropicais. Em

oito países da América Latina, estas enfermidades causam perdas econômicas anuais estimadas em 1,5 bilhões de dólares.

Segundo Arteche (2002), os prejuízos específicos causados pelos agentes da Tristeza Parasitária dos Bovinos são difíceis de calcular, pois não só se revelam pela morbidade e mortalidade. Também é necessário considerar as seqüelas que impedem o desenvolvimento normal e diminuem a resistência natural dos animais. Isso torna os mesmos susceptíveis a outras doenças e reduzem os índices de produtividade do rebanho.

Os prejuízos causados pelo carrapato *Boophilus microplus* e pelo complexo da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) no Brasil foram avaliados em 1 bilhão de dólares (BRASIL, 1983), sendo esse valor reavaliado por Grisi *et al* (2000), estimando as perdas em cerca de 2 bilhões de dólares.

Em levantamento feito pela Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria de 1964 a 2008, foram realizadas 6.706 necropsias de bovinos em que a tristeza parasitária bovina foi a principal doença diagnosticada na categoria de doenças inflamatórias e parasitárias respondendo por mais de 30% das causas de mortalidade (LUCENA *et al*, 2010).

Estudo retrospectivo feito na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas de 1978 a 2005 determinou, que em uma população regional de dois milhões seiscentos e trinta mil bovinos, as perdas anuais resultantes da tristeza parasitária bovina são estimadas em 6.220 bovinos ou um U\$ 1.623.000,00, comprovando a necessidade do uso de medidas preventivas contra a tristeza bovina (ALMEIDA *et al*, 2006).

## 2.9 Controle

A quimioprofilaxia consiste na aplicação de doses subterapêuticas de um produto de atividade conhecida e específica contra o agente que se deseja controlar. Com isso evita-se o aparecimento de altas parasitemias, mantendo o agente em níveis subclínicos, e propiciando a situação de portador (RIBEIRO & PASSOS, 2002). A desvantagem desse método é o uso contínuo de medicamentos podendo levar ao aparecimento de resistência, além do alto custo.

*Anaplasma marginale* foi atenuado por irradiação de uma cepa virulenta e passagens sucessivas dos organismos irradiados em ruminantes, não incluindo bovinos, como cervídeos e ovinos, por exemplo (RISTIC *et al*, 1968 citado por

GONZÁLES *et al.*,1976). Apesar desses estudos, não foi possível atenuá-lo de forma eficiente e continuou mantendo a sua patogenicidade.

*Anaplasma centrale* também é utilizado como imunógeno contra *A. marginale*, devido à imunidade cruzada entre os agentes e a pouca virulência de algumas cepas deste hemoparasito. Schenk *et al* (1993) obteve taxas de proteção de 95% utilizando *A. centrale* em bovinos expostos ao desafio pelo carrapato à campo.

Após obtenção e isolamento de cepas puras de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (KESSLER *et al*, 1987a), seguindo o método australiano de atenuação de cepas de babesias descrito por Callow & Mellors (1966), KESSLER *et al* (1987b) atenuaram cepas de *Babesia bovis* após dezesseis passagens rápidas em terneiros esplenectomizados com inóculos variando entre  $10^7$  e  $10^{11}$  eritrócitos parasitados. As cepas de *Babesia bigemina* foram atenuadas com quatro passagens lentas em terneiros infectados de acordo com o método de Callow (1978), tendo sido o período entre passagens de três a sete meses utilizando-se como inoculo o sangue parasitado da recidiva após esplenectomia. Essas cepas atenuadas foram testadas como vacina apresentando resultados satisfatórios no mesmo trabalho.

Existe, no mercado brasileiro, atualmente, somente uma vacina viva, trivalente, refrigerada e atenuada disponível comercialmente e com registro no Ministério da Agricultura sendo produzida por laboratório licenciado por esse órgão governamental desde 1990 (ANEXO A).

Apesar da disponibilidade de vacina atenuada refrigerada, altamente confiável quanto à pureza, eficiência e segurança, ainda persiste no Brasil o uso da premunição tradicional (tab.1). Esta se baseia na inoculação de sangue total de animais adultos de campo, portadores de um dos agentes, virulento, da tristeza. Tal método, entretanto, apresenta muitas limitações, entre elas, a principal é o risco de disseminação de outras doenças transmissíveis pelo sangue, como leucose bovina, rinotraqueíte infecciosa dos bovinos (IBR), diarreia bovina a vírus (BVD), tuberculose e a leptospirose que podem tornar-se endêmicas, principalmente nos rebanhos leiteiros (KESSLER *et al.*2002).

Tabela 1- Quadro comparativo entre premunição e vacinação

|                    | PREMUNIÇÃO                   | VACINAÇÃO                                       |
|--------------------|------------------------------|-------------------------------------------------|
| DOADOR             | bovinos de campo             | bezerros controlados                            |
| INÓCULO            | desconhecido                 | conhecido e titulado                            |
| VOLUME DE SANGUE   | 3 a 10 mL (por dose)         | 0,2 a 0,6 mL (por dose)                         |
| ACOMPANHAMENTO     | intensivo (diário)           | observação                                      |
| PATOGENICIDADE     | alta, organismos virulentos  | baixa, org. atenuados                           |
| ESTABILIDADE       | baixa                        | Estável                                         |
| PROTEÇÃO           | Boa<br>Com 2 a 3 inoculações | Muito boa<br>Acima de 95% com uma<br>inoculação |
| RISCO CONTAMINAÇÃO | muito alto                   | muito baixo                                     |

Fonte: KESSLER, R.H. & SCHENK, M. A.M. C, 1998.

Para evitar os problemas da premunição clássica como o uso de agentes virulentos, a vacinação vem sendo cada vez mais utilizada assim como é utilizada em outros países desde 1960. O método consiste na utilização de inóculos padronizados para cada agente de TPB, mantidos sob refrigeração (2 a 8°C) e prontos para aplicação. Os inóculos são produzidos em terneiros esplenectomizados, mantidos em isolamento, livres de carrapatos, moscas e doenças infecciosas desde o nascimento. O número de parasitos por mL de sangue é determinado pelo cálculo da titulação padrão. Com esse método é possível prever com relativa confiança o período em que os animais apresentarão as reações vacinais esperadas e a intensidade das manifestações conforme cada indivíduo, facilitando e racionalizando a prevenção.

Com o advento da tecnologia de DNA recombinante, os trabalhos de pesquisa mais recentes estão direcionados para o desenvolvimento de uma nova geração de vacinas, baseados na clonagem de genes que expressem proteínas relevantes do parasito (RIBEIRO & PASSOS, 2002)

## 2.10 Tratamento

As tetraciclina são os antibióticos de escolha para o tratamento da anaplasmosse aguda e a resistência ainda não foi descrita. Na anaplasmosse aguda, a administração de oxitetraciclina intravenosa, 11mg/Kg uma vez ao dia por 3 a 5 dias é efetiva. Uma a duas administrações de oxitetraciclina de longa ação (LA) na dose de 20mg/Kg a intervalos de 72 horas também é efetiva no tratamento. Para a esterilização de bovinos infectados por *A. marginale*, 2, 3, ou 4 aplicações de oxitetraciclina LA, nessa mesma dose com intervalos de 7 dias é eficaz na eliminação do estado de portador crônico.

O diaceturato de diaminazeno a 7% na dose de 3,5 mg/Kg é a medicação mais utilizada no tratamento das babesioses.

Juntamente com a terapia antimicrobiana, a terapia de suporte é importante. Se o VG é de 12% ou abaixo, a transfusão sanguínea é indicada para prevenir a morte e diminuir o período de convalescência, de 4 a 8L de sangue são administrados em um bovino adulto. Volume globular de 8% ou abaixo, indica prognóstico desfavorável e a morte ocorre mesmo com antibioticoterapia apropriada e terapia de suporte.

O dipropionato de imidocarb também pode ser usado no tratamento da anaplasmosse e babesiose, e a dose recomendada é de 1,2 mg/kg por via subcutânea, para as babesias. Doses de 2,4 mg/Kg para bovinos infectados com *A. marginale* são eficientes para o tratamento (FONSECA, 2011).

## 2.11 Diagnóstico

No diagnóstico da infecção dos bovinos por *Babesia* spp. e *Anaplasma marginale* sempre deve ser levada em conta a existência de fatores que possam favorecer o parasito em sua relação com o hospedeiro, ou seja, a exposição do bovino a uma carga parasitária capaz de superar suas defesas. Segundo Kessler *et al.* (1992) essa situação epidemiológica pode ocorrer após uma redução temporária da população de carrapatos, devido a condições climáticas desfavoráveis e/ou técnicas de manejo (descanso de pastagens, uso intensivo de carrapaticidas), a introdução de animais não imunes em áreas infestadas por carrapatos, além da entrada de animais infestados por carrapatos em áreas livres.

### 2.11.1 Diagnóstico Direto

O exame direto, para detecção e identificação dos parasitos no bovino deve utilizar sangue venoso ou capilar (sobretudo quando houver suspeita de infecção por *Babesia bovis*) com o qual é feito um esfregaço delgado ou por gota espessa, corado por Giemsa ou May-Grünwald/Giemsa e examinado em microscópio ótico (KESSLER & SCHENK, 1998).

Para o diagnóstico direto do parasito em animal necropsiado, é recomendado o preparo de “claps” ou impressões, principalmente do cérebro, que devem ser fixados e corados da mesma forma que o esfregaço de sangue, por Giemsa ou May-Grünwald/Giemsa (KESSLER & SCHENK, 1998).

### 2.11.2 Diagnóstico Indireto

Em animais portadores, a detecção de *Babesia* e *Anaplasma* pelo exame direto é muito difícil, devido às baixas parasitemias. Nesse caso, são usadas técnicas que permitem detectar e quantificar os anticorpos específicos contra os agentes (WEILAND & REITER, 1988).

Mahoney (1962a) demonstrou a presença de anticorpos específicos fixadores de complemento no soro de animais portadores de *Babesia* spp. Posteriormente, outras técnicas de diagnóstico sorológico foram desenvolvidas, como hemaglutinação indireta (CURNOW & CURNOW, 1967), Reação da Imunofluorescência Indireta (ROSS & LÖHR, 1968), aglutinação capilar (LÖHR & ROSS, 1969), aglutinação em placa (CURNOW, 1973b), aglutinação em cartão (TODOROVIC & KUTTLER, 1974), aglutinação em látex (LOPEZ & TODOROVIC, 1978), radioimunoensaio (KAHL *et al.*, 1982) e ELISA – “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay” (WALTISBUHL *et al.*, 1987a).

Atualmente, são utilizadas no diagnóstico de rotina para babesias e anaplasma, as técnicas de ELISA e Reação da Imunofluorescência Indireta (RIFI) (BÖSE *et al.*, 1995). Segundo Araújo *et al.* (1998), ambas as técnicas se equivalem para detectar anticorpos anti-*Babesia bovis*, com uma concordância de 96,6%.

O teste de ELISA apresenta como fator limitante a dificuldade de obtenção de antígenos de alta qualidade, sobretudo de *Babesia bigemina*, o que afeta sua sensibilidade e especificidade (BÖSE *et al.*, 1995). Segundo Sacco (1996), a utilização de antígenos brutos produzidos a partir de sangue com baixa parasitemia por *Babesia bovis* pode produzir reações de baixa especificidade e sensibilidade. No

entanto, segundo Machado (1995), já foram obtidos antígenos, mesmo de *Babesia bigemina*, de boa qualidade. De acordo com o autor, é um teste muito sensível, de leitura objetiva que permite a análise de um grande número de amostras.

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é ainda a mais utilizada para o diagnóstico de animais portadores de *Babesia* spp. e *Anaplasma marginale*, embora seja de difícil padronização (pelo julgamento subjetivo do operador), extenuante para quem a executa, o que limita o número de amostras a serem examinadas em um dia, além de ter especificidade discutível para *Babesia bigemina* (BIDWELL *et al.*, 1978; WRIGHT, 1990).

Tamura *et al.* (1980) consideram o teste de IFI específico e com suficiente sensibilidade para detectar casos subclínicos de babesiose, concordando com Ross & Löhr (1968).

A IFI é espécie-específica e detecta níveis de anticorpos persistentes por um longo período. Anticorpos contra *Babesia bovis* (JOHNSTON & TAMMEMAGI, 1969) e *Babesia bigemina* (ROSS & LÖHR, 1968) foram detectados por aproximadamente 1 e 2 anos, respectivamente.

A ocorrência ou não de reação cruzada entre *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* foi estudada por vários autores. Segundo Johnston *et al.* (1973), não há essa reação e a técnica de IFI é confiável para indicar portadores de infecção. No entanto, outros autores afirmam que ocorre a reação cruzada, mas os antígenos comuns a ambas as espécies não chegam a alterar os resultados da IFI, pois há diferenças antigênicas suficientes, que permitem a identificação de cada uma (GOLDMAN *et al.*, 1972; LEEFLANG & PERIÉ, 1972; BESSENGER & SCHOEMAN, 1983). O antígeno de *Babesia bigemina* pode causar problemas na prova de IFI por apresentar títulos máximos de 1:1280, 21 dias após infecção experimental (ROSS & LÖHR, 1968), e reações inespecíficas, capazes de confundir com os títulos baixos de animais infectados (CALLOW *et al.*, 1974b).

A prova de IFI detecta anticorpos anti-*Babesia* cerca de 10 dias após a infecção (KUTTLER *et al.*, 1977). Em condições de campo, a IFI, é capaz de detectar anticorpos anti-*Babesia bigemina* durante 4,5 semanas, e anticorpos anti-*Babesia bovis* por um período médio de 6,5 semanas, após o desafio pelo carrapato (TODOROVIC & LONG, 1976). No entanto, segundo Ross & Löhr (1968),

os anticorpos anti-*Babesia bigemina* podem ser detectados até 24 meses após uma infecção experimental.

A detecção de anticorpos através da prova de IFI é bastante usada em levantamentos epidemiológicos, para avaliar a prevalência de infecção por *Babesia* spp. e *Anaplasma*, uma vez que, em animais portadores, a parasitemia geralmente não é detectável no exame direto (WEILAND & REITER, 1988). Segundo os autores o conhecimento da percentagem de animais portadores revela, por outro lado, os grupos de risco de um rebanho, sendo fundamental para a elaboração de programas de controle da doença, como, por exemplo, a necessidade ou não de vacinação.

### 2.11.3 Diagnóstico molecular

Recentes avanços da Biotecnologia tem permitido visualizar um amplo espectro de novas ferramentas com grande potencial para o diagnóstico de babesiose/anaplasmoses. O desenvolvimento de sondas de DNA (ABOYTES-TORRES & BUENING, 1990; VISSER & AMBROSIO, 1987) capazes de reconhecer fragmentos específicos de DNA, baseando-se no fato de que cada espécie possui uma sequência única que os diferencia de organismos até mesmo estreitamente relacionados, proporcionando um nível de especificidade muito alto para estes testes (STILLER, 1990). A reação da polimerase em cadeia (PCR) (SAIKI *et al.*, 1985) é uma técnica laboratorial que está adquirindo crescente difusão, em consequência da habilidade de amplificar especificamente uma sequência alvo de DNA, em mais de um milhão de vezes no espaço de poucas horas (RAYMOND *et al.*, 1990).

## 2.12 Vacinas

Há dois métodos básicos pelos quais qualquer animal pode se tornar imune a uma doença infecciosa: a imunização passiva e a ativa. A imunização passiva gera imunidade temporária pela transferência de anticorpos de um animal resistente a outro suscetível. Estes anticorpos, transferidos de forma passiva propiciam proteção imediata, no entanto, devido a um catabolismo gradual, essa proteção diminui em intensidade, e o receptor, eventualmente, torna-se mais uma vez suscetível.

A imunização ativa, ou seja, vacina, em contraste, envolve a administração de antígenos a um animal, de tal forma que este responda pelo estabelecimento de

uma resposta imunológica. Uma nova imunização ou vacinação resultará em uma resposta imunológica secundária e na melhora acentuada da imunidade (TIZARD, 2009).

Vários métodos de vacinação têm sido desenvolvidos e estudados em condições de laboratório e de campo, como medidas imunoproláticas contra a babesiose e anaplasmoze bovina. Na maioria deles, utiliza-se como vacina hemácias parasitadas de animais geralmente esplenectomizados, contendo formas vivas atenuadas (CALLOW & MELLORS, 1966) ou inativadas (TAYLOR, 1989). Outra linha de pesquisa explora o uso de estágios de *Babesia* no carrapato (esporozoíto) como um meio de indução de imunidade protetora contra essa parasitose (McELWAIN *et al.*, 1992).

As vacinas atenuadas com *Anaplasma centrale*, *B. bigemina* e *B. bovis* são usadas, com resultados satisfatórios, em determinados países como: Austrália, Argentina, Uruguai, Israel, África do Sul e Venezuela, especialmente nas áreas de instabilidade enzoótica (PIRANO *et al.* 1985; ABDALA *et al.*, 1990). No Brasil, trabalhos com o isolamento e a atenuação de amostras de campo de *B. bigemina* e *B. bovis* foram desenvolvidos inicialmente na EMBRAPA-CNPQC, seguindo-se a metodologia australiana (KESSLER *et al.*, 1987a, 1987b; KESSLER *et al.*, 1991). Testes avaliando a patogenicidade e imunogenicidade dessas amostras demonstraram baixa patogenicidade para *B. bovis*, pois não foram observados casos de doença clínica após vacinação. Em relação à *B. bigemina*, essa amostra apresentava relativa virulência, sendo verificada a doença clínica em alguns animais. Nesses testes, foram demonstrados também que as duas amostras eram altamente imunogênicas, protegendo os animais contra posterior desafio. Atualmente, existe uma vacina comercial e outras amostras vacinais com resultados promissores em diferentes centros de pesquisa. Em associação com as amostras atenuadas de *Babesia*, é utilizado o *A. centrale*, em função de sua menor patogenicidade, que confere proteção parcial contra o *A. marginale*. Essa vacina tem sido usada em vários países, inclusive no Brasil (KESSLER *et al.*, 1991).

Vacina atenuada, trivalente, refrigerada e pronta para aplicação foi desenvolvida e produzida em escala industrial, pioneiramente, no Brasil pelo Dr. Carlos C. P. Arteché no Rio Grande do Sul em 1987. Essa vacina, a Eritrovac, é atualmente a única disponível no mercado nacional, com licença e registro no Ministério da Agricultura desde 1990. Segundo Arteché (1992) e Arteché (2004) a

vacina refrigerada trivalente é a forma mais prática, econômica, segura e eficiente de prevenir a tristeza parasitária dos bovinos.

O controle de carrapato, associado à vacinação de animais susceptíveis, constitui uma medida apropriada de profilaxia dessa hemoparasitose em determinadas áreas de instabilidade enzoótica. Para a anaplasmose, deve-se manter o controle de moscas na propriedade, principalmente nas estações chuvosas, quando a população de dípteros hematófagos é maior, controlando assim as taxas de infecção por *A. marginale*.

O uso de *Anaplasma centrale* como vacina contra o *Anaplasma marginale* ocorre há mais de noventa anos e demonstrou comprovadamente ser a ferramenta de manejo preventivo mais eficiente no combate a essa enfermidade, com resultados satisfatórios em nível de campo em vários países (MELÉNDEZ, 2003). Na Austrália, Bock e de Vos (2001) demonstraram que o uso do *Anaplasma centrale* como vacina se justifica uma vez que animais vacinados foram desafiados com o *Anaplasma marginale* e apresentaram baixos índices de reações e desenvolvimento de sintomas clínicos.

Tizard (2009) publicou que os méritos das vacinas vivas sobre as inativadas são a necessidade de menos doses, não há necessidade de adjuvantes, menor chance de hipersensibilidade, indução de interferons, baixo custo, necessidade de uma dose menor, estimulam tanto a resposta humoral quanto a mediada por células e maior duração da proteção.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

A etapa de campo do experimento teve duração de seis meses, de novembro de 2009 a maio de 2010.

#### **3.1 Locais de Execução do Experimento**

A etapa de campo foi realizada na Estância Sertãozinho localizada no 6º distrito, Rincão do Artigas, município de Santana do Livramento - RS. Esta propriedade caracteriza-se pela produção extensiva, pastoreio contínuo em campo nativo, de bovinos de corte predominando as raças hereford, braford e o cruzamento entre elas. A fazenda está localizada entre os paralelos 32°N e 32°S, em área marginal para a ocorrência de carrapatos, com grandes flutuações populacionais do ácaro, que caracteriza o estado de instabilidade enzoótica para a babesiose e anaplasmosse bovina na região.

A etapa laboratorial foi realizada no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) campus Capão do Leão - RS.

As provas sorológicas foram realizadas no Laboratório de Hemoparasitologia do Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sul-brasileiros (CPPSul) EMBRAPA, Bagé-RS.

As análises das lâminas com amostras de sangue em esfregaço e hematócrito foram feitas no Centro de Pesquisa e Tecnologia Animal Dr. Carlos Arteche (CPTA-

Hemopar) localizado no 5º distrito Ibirapuitã, município de Santana do Livramento – RS.

### **3.2 Animais Experimentais**

O período de nascimento dos animais experimentais foi de 19 de agosto de 2009 a 30 de outubro de 2009. Todos os animais estavam em aleitamento e pastoreio contínuo em campo nativo, tendo sido mantidos livres de infestação por carrapatos e moscas hematófagas desde o nascimento até a formação dos grupos aos sessenta dias de vida. A manutenção da condição de livres de carrapatos até o início do experimento (d.0) foi feita com a aplicação de duas doses de ivermectina 1,5% (Baymec Prolong – Bayer) sendo a primeira no dia do nascimento (1 ml, subcutâneo) e a segunda com 30 dias de vida (2 ml, subcutâneo)

### **3.3 Formação dos Grupos**

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos com n=30, sendo 15 fêmeas e 15 machos em cada grupo. Os dois grupos permaneceram no mesmo campo (potreiro ou invernada) do nascimento até o desmame (final do experimento). Todos os animais experimentais possuíam sangue Hereford cruza Braford

O GRUPO I (Grupo Teste): livre de carrapatos e moscas hematófagas desde o nascimento até o desmame, com oito meses de idade, e vacinados contra tristeza parasitária bovina.

O GRUPO II (Controle): livre de carrapatos e moscas hematófagas do nascimento até dois meses de vida. Após a formação do grupo, sofreu infestação natural por carrapatos “carrapateamento” e moscas dos chifres, seguindo o manejo sanitário tradicional da propriedade até o desmame com oito meses e final do experimento.

### **3.4 Tratamentos Carrapaticidas e Mosquicidas**

A partir da formação dos grupos, o GRUPO I sofreu tratamentos carrapaticidas e mosquicidas com intervalo de 45 dias desde o d.0 (aos dois meses de idade) até o dia do desmame (d. 180) para que fosse mantido livre de carrapatos e moscas hematófagas impedindo, assim, a inoculação dos agentes da tristeza parasitária bovina (Figura 5). O tratamento carrapaticida constou da aplicação de

Ivermectina 3,15% (Ivomec Gold 3,15% - Merial) com dose calculada sempre a partir do animal mais pesado do lote. Como tratamento mosquicida e repelente foi utilizada a fórmula comercial: Cipermetrina 5g + Clorpirifós 7g + Butóxido de Piperonila 5g + Citronela 0,50g + veículo qsp. 100.000 mL (Cyperclor Plus Pour-on – Vetbrands) na dosagem de 1 mL para cada 10 Kg de peso vivo por animal.

O GRUPO II (controle) seguiu o manejo normal da propriedade a partir da formação do grupo (d.0). Recebeu tratamento carrapaticida no dia 28 de dezembro de 2009 a base de Ivermectina 1% (Megamectin 1% - Novartis), 1 mL para cada 50 Kg de peso vivo e cipermetrina 5g (Cyperpour-on – Vetbrands) na dosagem de 1 mL para cada 50 Kg de peso vivo. No dia 23 de abril de 2010, os animais deste grupo receberam banho carrapaticida de aspersão com amitraz. Este grupo foi submetido à infestação natural por carrapatos e moscas hematófagas com o objetivo, segundo o proprietário, de promover imunização contra os agentes da tristeza parasitária bovina (Fig. 5).

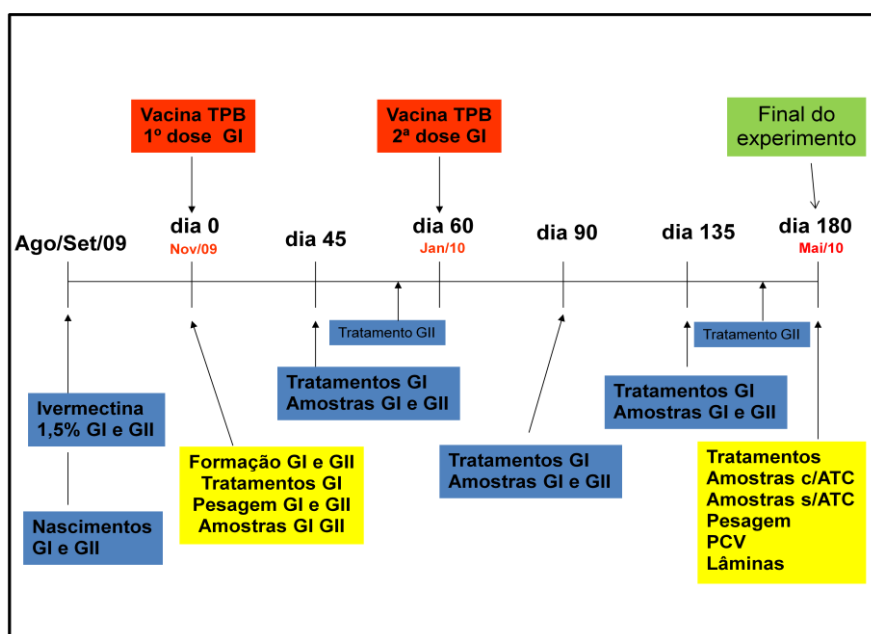


Figura 5 - Síntese do cronograma do experimento.

### 3.5 Vacinação Contra Tristeza Parasitária Bovina

O GI recebeu duas doses da vacina contra tristeza bovina (Eritrovac – Laboratório Hemopar) atenuada, refrigerada e trivalente, isto é, composta por cepas atenuadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e cepa de *Anaplasma centrale*. Seguiram-se corretamente as instruções do laboratório fabricante contidas na bula do produto (ANEXO A). Foram aplicadas duas doses com intervalo de sessenta dias sendo a primeira no d.0 (12 de novembro de 2009) e a segunda no d.60 (janeiro 2010). A dose utilizada foi de 3 ml por via subcutânea com uso de seringa mantida sob refrigeração e ao abrigo de luz solar direta.

### 3.6 Controle das Reações Vacinais

Considerando-se que até 5% dos animais vacinados podem apresentar algum tipo de reação como prostração, anorexia passageira e aumento de temperatura corporal, o laboratório fabricante recomenda que sejam feitas revisões diárias dos animais vacinados durante o período de prováveis reações vacinais ou de multiplicação dos parasitos vacinais. Diariamente os animais foram inspecionados à distância, sem movimentá-los ou estressá-los, pelos funcionários da propriedade desde a aplicação da primeira dose até 40 dias após a aplicação da segunda dose.

### 3.7 Pesagens

Duas pesagens foram efetuadas, sendo a primeira na formação dos grupos dia 12 de novembro de 2009 (d.0), aos dois meses de idade, e a segunda no dia 13 de maio de 2010 (d.180) quando os animais foram desmamados aos oito meses de idade. Foram avaliados o peso médio inicial (PMI), peso médio final (PMF) e o ganho de peso médio final (GMF) de cada grupo

### 3.8 Amostras de Sangue

Foram colhidas amostras de sangue, dos dois grupos, diretamente da veia jugular, sem anticoagulante. Para a obtenção do soro, o sangue coletado sem anticoagulante foi deixado à temperatura ambiente e em estufa a 37°C por 8 horas até a formação do coágulo. Posteriormente, foi refrigerado a 4°C por 24 horas para completar a retração do coágulo. Após centrifugação a 1500 rpm, durante

10 minutos, o soro foi separado em alíquotas e congelado a -20°C até a realização das provas sorológicas. Os intervalos das coletas, dos dois grupos, foram de 45 dias a contar do início do experimento (Fig. 5). No final do experimento foram coletadas amostras com anticoagulante para confecção dos esfregaços sanguíneos em lâmina e avaliação do hematócrito. Cuidados foram tomados com a limpeza do local e contenção adequada com buçal de corda de algodão, para minimizar o estresse dos animais durante o procedimento, seguindo normas de bem estar animal e manejo racional de bovinos de corte.

### 3.9 Análise Sorológica

A sorologia foi feita com o objetivo de determinar os níveis de anticorpos específicos (IgG) anti-*Babesia bovis*, anti-*Babesia bigemina* e anti-*Anaplasma marginale*. O título de anticorpos anti-*Babesia* spp. e anti-*Anaplasma marginale* foi determinado pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

A RIFI foi realizada na Embrapa- CPPSul – Bagé, laboratório de hemoparasitologia, seguindo os procedimentos e protocolos descritos por Madruga et al (2001).

A prova de RIFI consiste em tornar visível a reação antígeno-anticorpo marcando um dos reagentes com fluorocromo, que possui a capacidade de absorver energia luminosa, tornando-se excitado por um curto espaço de tempo ( $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  segundos) para, em seguida, emití-la em forma de fluorescência ao retornar ao seu estado normal. O fluorocromo empregado foi o isotiocianato de fluoresceína que emite fluorescência verde (Fig. 6).

Foram feitas diluições duplas dos soros, em PBS, a partir de 1:160 para as babesias e 1:320 para anaplasma. As lâminas de antígeno foram retiradas do freezer imediatamente antes do uso, secas a 37°C, por 10 minutos, em estufa. Após, foram marcadas com círculos (três linhas, com nove ou mais círculos cada, feitos com esmalte para unhas), onde foram colocados 10µl de cada diluição dos soros, de controles positivo, negativo e PBS duplicados. A diluição máxima avaliada foi de até 1:5120.

As lâminas foram incubadas a 37°C, em câmara úmida, por 30 minutos. Após, o soro foi desprezado, as lâminas lavadas três vezes com PBS pH 7,2 sob fraca agitação por 10 minutos, e secas no ventilador.

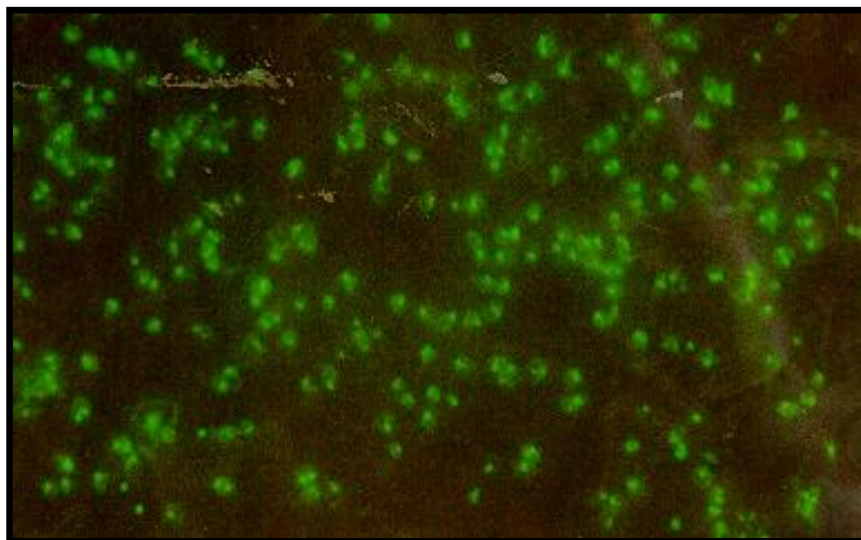


Figura 6 - Reação positiva de RIFI. Aumento 40x.  
Fonte: Monticelli (2000).

O conjugado (Anti-Bovine IgG - whole molecule - FITC conjugate. Sigma Chemical Company) foi diluído em PBS 1:640 para anaplasma e 1:320 para as babesias, sendo colocados 10µl em cada círculo, em local escuro. As lâminas foram incubadas como anteriormente (por 30 minutos a 37°C em câmara úmida). Após, foram lavadas duas vezes em PBS durante 10 minutos e uma vez em solução tampão de lavagem, por cinco minutos, e secas no ventilador em local escuro. As lâminas foram examinadas em microscópio com fonte de luz ultravioleta, com objetiva de 40x e ocular de 100x.

Para obtenção da titulação, foram feitas diluições das amostras até não apresentarem mais fluorescência ao microscópio, considerando como titulação da amostra, a maior diluição em que ocorreu reação.

O laboratório de hemoparasitologia da Embrapa-CPPSul considera que um animal possui um grau de proteção eficiente, contra os agentes da tristeza parasitária bovina, quando apresenta títulos iguais ou superiores a 1:640 (GOMES, 2011).

### **3.10 Determinação do Hematócrito e Esfregaços em Lâminas**

O sangue coletado no último dia do experimento, com anticoagulante (EDTA), foi utilizado para determinar o hematócrito pela técnica do microhematócrito. O sangue foi colocado em tubos capilares, centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos e o resultado foi lido no cartão de leitura (SINK e FELDMAN, 2006).

Das amostras coletadas no desmame, também foram feitos esfregaços em lâminas, e coradas com Single Prov (Newprov), para pesquisa direta dos parasitos da tristeza parasitária bovina ao microscópio óptico em aumento de 1000x.

### **3.11 Custos com Tratamentos**

Considerando-se apenas os custos com medicamentos carrapaticidas, repelentes, mosquicidas e vacina aplicados nos animais dos dois grupos desde o nascimento até o desmame (d. 180), assim como a morte de algum animal durante o experimento, foi calculado o custo total do protocolo de cada grupo no período. Não foram levadas em consideração as perdas indiretas pelo parasitismo por carrapatos, moscas hematófagas, miíases, verminose e suas seqüelas. Os cálculos tiveram como base os valores reais de mercado dos medicamentos na época do experimento.

No GI (teste) cada animal recebeu um total de duas aplicações de Ivermectina 1,5% (Baymec Prolong – Bayer – R\$ 250,00/L), e 3 mL foram administrados com custo total de R\$ 0,75 (setenta e cinco centavos) por animal sendo a primeira dose (1 mL) no dia do nascimento e a segunda (2 mL) trinta dias após. Receberam 5 aplicações de Ivermectina 3,15% (Ivomec Gold – Merial – R\$ 350,00/L) totalizando 20 mL do medicamento com um custo total de R\$ 7,00 (sete reais) por animal. Foram tratados 5 vezes com medicamento Pour-on a base de Cipermetrina (Cyperclor Plus Pour-on – Vetbrands – R\$ 24,00/L) recebendo um total de 100 mL durante o período com custo igual a R\$ 2,40 (dois reais e quarenta centavos) por animal. Foram aplicadas duas doses da vacina refrigerada contra tristeza bovina (Eritrovac – Laboratório Hemopar – R\$ 2,50/dose) a um custo total de R\$ 5,00 (cinco reais) por animal.

Cada animal do GII (controle) recebeu duas aplicações de Ivermectina 1,5% (Baymec Prolong – Bayer – R\$ 250,00/L), total de 3 mL com um custo de R\$ 0,75 (setenta e cinco centavos) por animal sendo a primeira no dia do nascimento e a segunda trinta dias após. Duas aplicações de ivermectina 1% (Megamectin 1% -

Novartis – R\$ 170,00/L) com total de 8 mL aplicados com custo de R\$ 0,80 (oitenta centavos) por animal. Apenas uma aplicação de Cipermetrina (Cyper pour-on – Vetbrands – R\$ 24,00/L) 15 mL por animal a um custo de R\$ 0,36 (trinta e seis centavos). Os animais deste grupo receberam também, um banho carrapaticida de aspersão com produto a base de Amitraz 12,5g (Tac Plus – Eurofarma – R\$ 37,18/L) com custo de R\$ 0,50 (cinquenta centavos) por animal.

### **3.12 Análise Estatística**

Os dados foram organizados em planilhas do programa Excel, para posteriormente serem analisados pelo programa Statistix 9.0. Análise descritiva dos dados referente a peso corporal e hematócrito dos animais dos grupos controle e vacinado, ao final do experimento, foi feita pela determinação da média, amplitude, desvio padrão e mediana. A comparação entre os grupos foi feita pela análise de variância, com o Teste LSD (Least Square difference), para médias de ganho de peso e hematócrito. Para a soroconversão, foi feita análise de frequência e aplicado o Teste Qui-Quadrado. Pelo teste de Fisher, foi avaliada a soroprevalência e homogeneidade dos grupos experimentais.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ganho de peso

As avaliações do ganho de peso foram feitas considerando-se o peso ao início do experimento e no dia do desmame, final do experimento, aos 8 meses de idade.

O Grupo I (vacinado) apresentou peso médio inicial de 79 Kg e peso médio final de 235,4 Kg com ganho médio de 156,4 Kg no período. O Grupo II (controle) teve peso médio inicial de 78,3 Kg e peso médio final de 204,9 Kg com um ganho médio de 126,5 Kg (Fig.7). A diferença de ganho de peso entre os dois grupos no período do experimento foi de 30,5 Kg, em média, por animal (tab. 2)

Segundo Woodham *et al* (1983), 30 Kg de carne por animal por ano são perdidos por causa da espoliação direta pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Tabela 2 - Análise descritiva dos dados referentes a peso corporal e hematócrito dos animais dos grupos controle (GII) e vacinado (GI) ao final do experimento.

|                | Peso     |          | Hematócrito |          |
|----------------|----------|----------|-------------|----------|
|                | Controle | vacinado | controle    | vacinado |
| n              | 29       | 30       | 29          | 30       |
| Média (Kg)     | 204,9    | 235,4*   | 33,5        | 45,8*    |
| Amplitude (Kg) | 136-245  | 200-270  | 22-53       | 30-57    |
| Desvio padrão  | 25       | 18,9     | 6,7         | 7,4      |
| Mediana (Kg)   | 202      | 230      | 33          | 46       |

Dados marcados com \* apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,025$ )

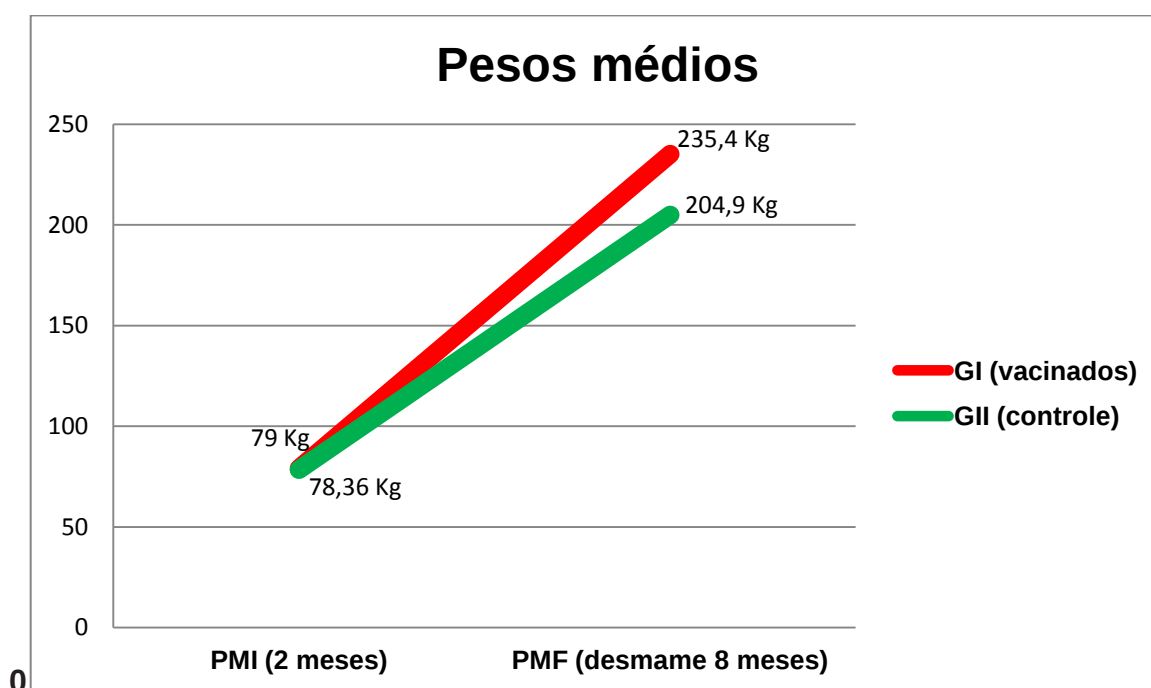


Figura 7 – Pesos médios no início e final do experimento Grupos I e II

## 4.2 Hematócrito e exame direto

O hematócrito ou volume globular (VG) é um dado clínico que se altera quando os parasitos se multiplicam e destroem as hemácias, ocasionando uma diminuição do eritron circulante (KERR, 2003), e conseqüentemente baixando seus valores.

Grupo controle apresentou uma queda no hematócrito de, em média, 27,3% em relação ao grupo vacinado ( $p \geq 0,025$ ) caracterizando um quadro, mesmo que dentro dos valores normais, de perda considerável de células sanguíneas (tab.2). Segundo Viana (2007), os valores de hematócrito considerados normais para bovinos variam entre 26 e 42%. Vale observar que os animais do grupo controle seguiram sofrendo espoliação por carrapatos, mesmo nos meses de inverno, e moscas dos chifres o que agravaria certamente o quadro de redução dos glóbulos vermelhos e conseqüente retardo no desenvolvimento como constatado na diferença de ganho de peso ao desmame.

Sacco (1996) mostrou que com a inoculação de *Babesia bovis* atenuada (vacina) houve uma queda no volume globular dos animais, em média de 20%, ou seja, o volume globular médio do grupo chegou a 28%, o que não chega a ser considerado um risco, sendo que os animais apresentaram recuperação rápida e completa dos valores normais sem auxílio de medicamentos. Isto pôde ser verificado neste experimento uma vez que todos os animais do grupo vacinado apresentaram hematócrito dentro da normalidade ao final do período de imunização e experimento. O grupo controle apresentou um animal com hematócrito de 22% valor este abaixo dos valores considerados normais por Viana (2007).

Durante o experimento um animal do grupo controle (carrapateado) foi a óbito por anaplasnose, diagnosticada por exame direto em lâmina e achados de necropsia.

Ao final do experimento, todas as lâminas analisadas dos dois grupos foram negativas para os três agentes da tristeza bovina. As baixas parasitemias que dificultam o diagnóstico direto em bovinos portadores, confirmam o observado por Weiland & Reiter (1988).

### 4.3 Sorologia

Os resultados da sorologia por RIFI mostraram que ao início do experimento (d.0) o grupo controle apresentou 16,7% de animais positivos para *Babesia bovis*, 6,7% para *B. bigemina* e 13,3% de positividade para *A. marginale*. As porcentagens foram similares às obtidas no grupo vacinado, que foram de 16,7%, 6,7% e 16,7% respectivamente (Fig.8). Pelo teste de Fisher não houve diferença significativa entre os grupos na sua formação ( $p>0,05$ ).

Segundo Smith (1982), geralmente ocorre maiores prevalências de anticorpos anti-*Babesia bigemina*, porque essa espécie tem maior potencial reprodutivo, além de poder ser transmitida por várias gerações de carrapatos sem necessidade de re-infecção. Isto não foi observado neste experimento uma vez que foi detectado maior número de animais soropositivos para *B. bovis* que para *B. bigemina*. Esse maior número de animais soropositivos para *B. bovis* em relação a *B. bigemina*, manteve-se alto até o final do experimento e com diferença estatística significativa.

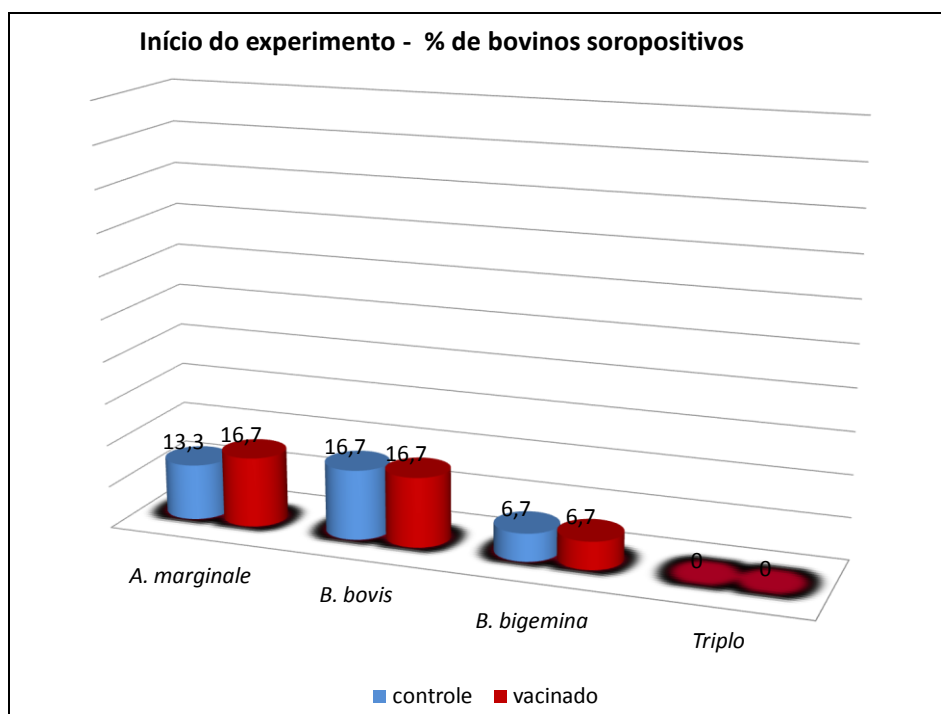


Figura 8 – Porcentagem de bovinos soropositivos no início do experimento nos grupos I (vacinado) e II (controle).

Na Fig.8, verifica-se que no início do experimento, houve presença de poucos animais soropositivos como resultado imunidade passiva, uma vez que os animais apresentavam idade de dois meses. A análise sorológica indica que os anticorpos anti-*Babesia* spp. e *A. marginale* adquiridos pelo colostro (imunidade passiva) vai decrescendo, chegando a níveis mais baixos no 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> mês de vida, confirmando o observado por diversos autores (Mahoney & Ross, 1972; Sanchez *et al.*, 1985; Rios *et al.*, 1988). A partir de então, eleva-se novamente, agora devido à imunidade ativa, ou seja, anticorpos formados pelo próprio terneiro contra os hematozoários inoculados pelo carrapato ou pela vacinação.

Ao final do experimento a porcentagem de animais no grupo controle soropositivos para *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina* e para os três agentes ao mesmo tempo foi de 44,8; 44,8; 13,8 e 0 respectivamente enquanto que no grupo vacinado os valores foram de 100% para todos os agentes inclusive com 100% dos animais positivos para os três agentes ao mesmo tempo (tab.3 e Fig.9). Estes resultados mostram que, mesmo tendo sofrido infestação natural por carrapatos desde o nascimento até o desmame, 55,2% dos animais estavam soronegativos para *Anaplasma marginale*, e para *B. bovis*, 86,2% para *B. bigemina* e 100% para os três agentes ao mesmo tempo. Estes resultados refletem a baixa taxa de inoculação dos hemoparasitos pelos carrapatos. De acordo com Aguirre *et al.* (1990), carrapatos coletados de zebuínos apresentam taxa de infecção de 5%, enquanto que carrapatos ingurgitados em bovinos de raças européias mostram taxa de 28%.

Brown *et al* (2006) mostrou que nas regiões onde os bovinos são naturalmente parasitados pelo carrapato desde o nascimento, há uma inoculação natural e gradual dos hemoparasitos, o que possibilita a esses bovinos o desenvolvimento da imunidade aos agentes causadores da babesiose. Discordando do acima descrito, este experimento demonstrou que há produção de resposta imune, mas de maneira irregular, nunca trivalente, com baixos níveis de proteção e com duração imprecisa.

Em trabalho realizado por Vieira *et al* (2003) animais foram separados em vários grupos. O grupo um foi tratado com doramectina dentro de um programa de controle estratégico integrado associado com uma vacina viva contra babesiose (Eritrovac – Lab. Hemopar – uma dose em novembro de 1999); o grupo dois foi tratado com o antígeno rBm 86 e tratamentos táticos com amitraz; grupo três medicado com ivermectina (3,15%); grupo quatro, denominado de “convencional”, foi

tratado com amitraz; o grupo cinco, chamado de “supressivo”, recebeu tratamentos a cada duas semanas com amitraz. As análises estatísticas evidenciaram não haver diferença significativa entre os níveis de proteção sorológica, através da RIFI, observados para todos os grupos experimentais. Esses resultados diferem dos encontrados neste trabalho uma vez que o grupo vacinado apresentou altos níveis de proteção e 100% dos animais vacinados apresentaram positividade ao desmame sem nunca terem entrado em contato com carrapatos e moscas dos chifres. Observa-se também, que a vacinação não foi feita conforme orientação e recomendação de bula do laboratório fabricante uma vez que foi utilizada somente uma dose da vacina e não duas como o recomendado. Este fato não favorece cientificamente os resultados obtidos por Vieira *et al* (2003) para o grupo 1.

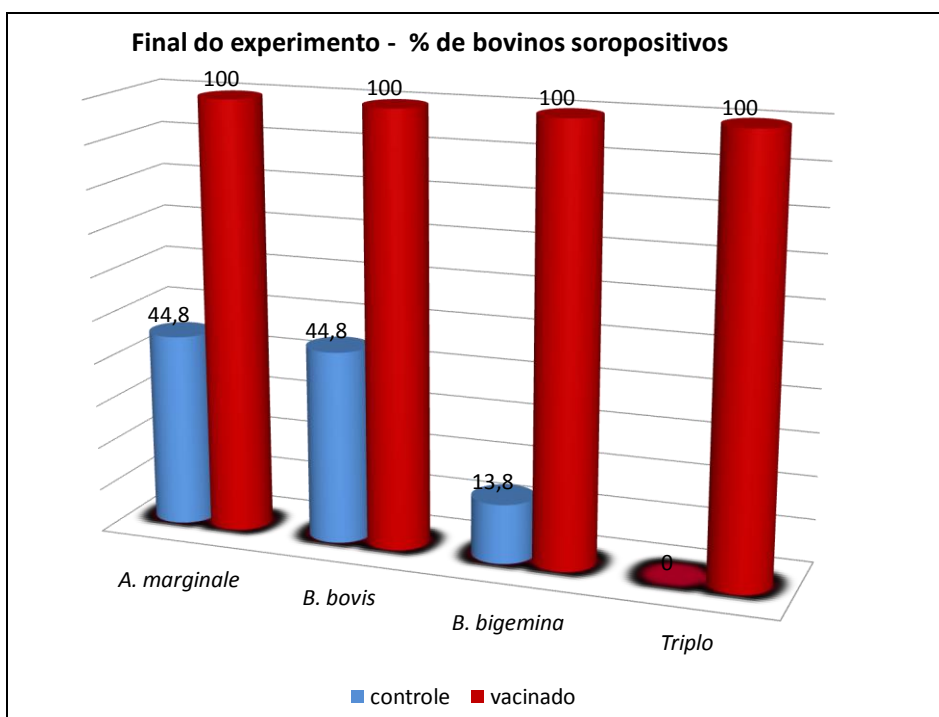


Figura 9 – Porcentagem de bovinos soropositivos ao final do experimento nos grupos I (vacinado) e II (controle).  $p \leq 0,025$ .

Considerando que animais com titulação igual ou acima de 1:640 na RIFI estão eficientemente protegidos, o grupo controle apresentou no início do experimento 0% de animais positivos em 1:640 ou acima para *A. marginale*, *B. bigemina* e para os três agentes e, 6,7% para *B. bovis* (Fig. 10).

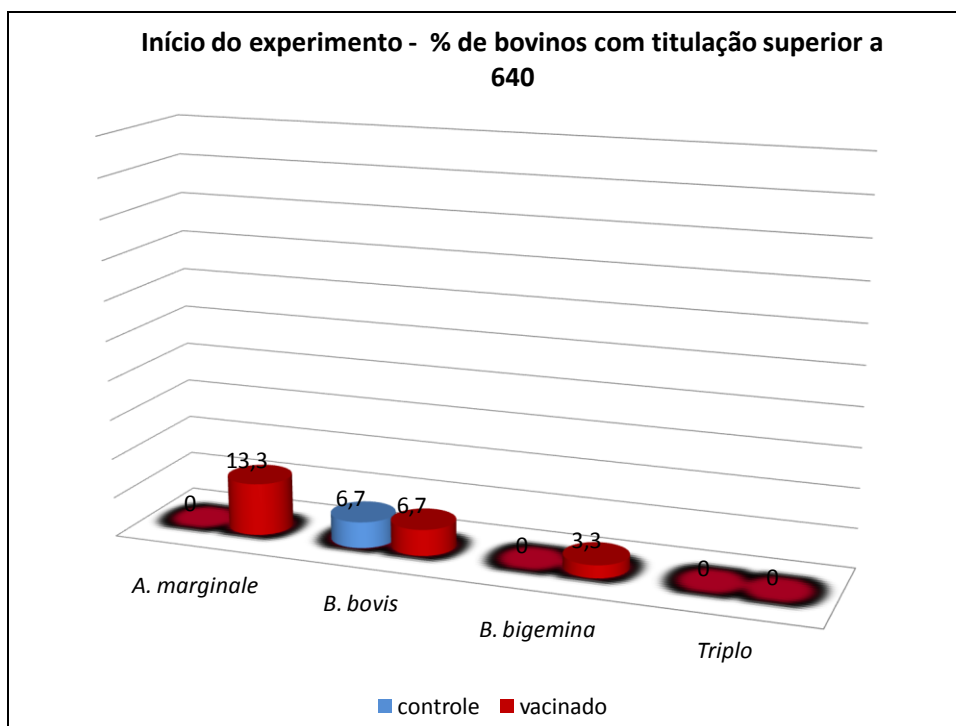


Figura – 10. Porcentagem de bovinos com diluição superior a 1:640 no início do experimento.

O grupo vacinado (teste) apresentou 13% dos animais com títulos acima ou iguais a 1:640 para *A. marginale*, 6,7% para *B. bovis*, 3,3% para *B. bigemina* e 0% para os três agentes ao mesmo tempo.

Ao final do experimento, ao desmame, observou-se uma elevação considerável nos níveis de proteção (igual ou acima de 1:640) e no número de animais protegidos nos dois grupos, tendo ocorrido diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,025$ ) entre os dois grupos (Fig.11) e dentro do mesmo grupo (Fig.12 e Fig.13).

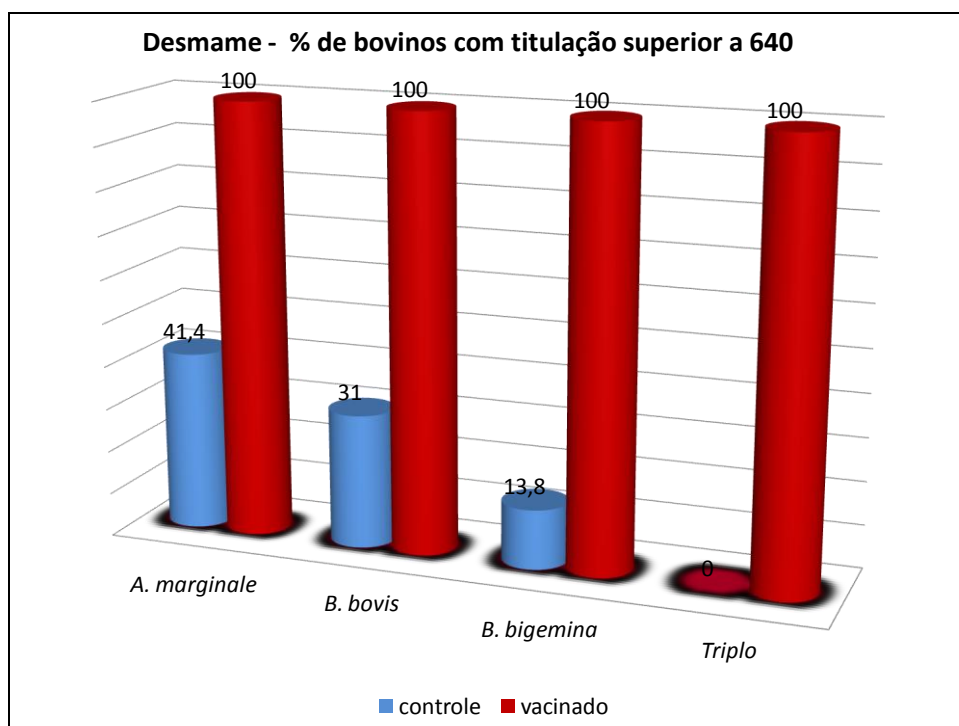


Figura 11 – Porcentagem de bovinos com diluição igual ou superior a 1:640 no final do experimento ( $p \leq 0,025$ ).

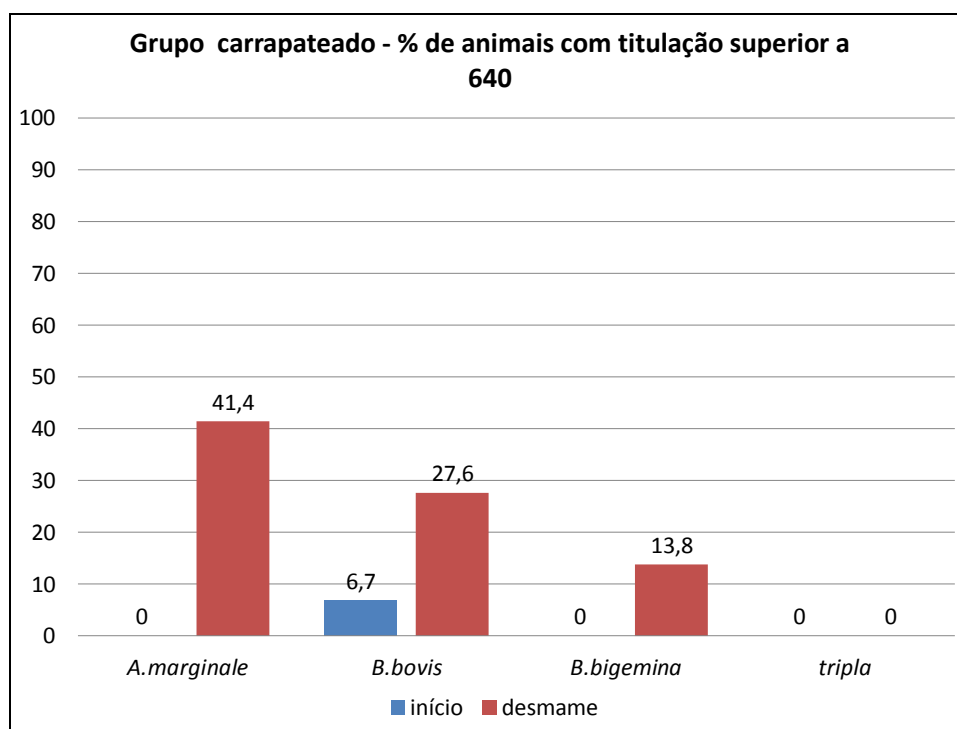


Figura 12 – Porcentagem de animais com diluição superior a 1:640 no início e final do experimento no grupo controle (carrapateado).  $p \leq 0,025$ .

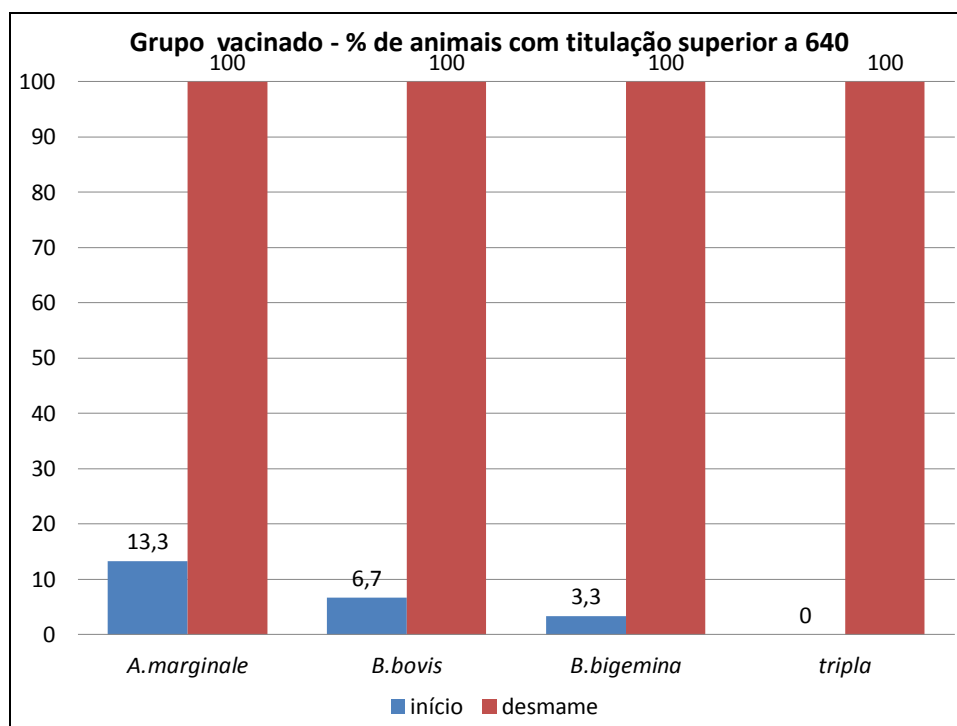


Figura 13 – Porcentagem de animais com diluição superior a 1:640 no início e final do experimento no grupo vacinado (teste).  $p \leq 0,025$ .

Além da diferença significativa no número de animais soropositivos entre os grupos controle e vacinado, o grupo vacinado (GI) apresentou 100% dos animais com títulos máximos iguais a 5120, para os três agentes, o que confere um alto nível de proteção. O grupo controle (GII) apresentou 4 animais com titulação máxima de 1:2560 para *A. marginale*, 4 animais para *B. bovis* e 2 para *B. bigemina* com títulos máximos em 1:1280 (tab.3).

Tabela – 3. Distribuição das diluições por RIFI para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* em bovinos vacinados contra TPB (duas doses) e naturalmente infectados (controle), ao desmame.

| Agente              | Diluição | Grupo Controle              |      | Grupo Vacinado              |      |
|---------------------|----------|-----------------------------|------|-----------------------------|------|
|                     |          | Número de animais positivos | (%)  | Número de animais positivos | (%)  |
| <i>B. bovis</i>     | 1:160    | 2                           | 6,9  | 0                           | 0    |
|                     | 1:320    | 3                           | 10,3 | 0                           | 0    |
|                     | 1:640    | 4                           | 13,8 | 0                           | 0    |
|                     | 1:1280   | 4                           | 13,8 | 0                           | 0    |
|                     | 1:2560   | 0                           | 0    | 0                           | 0    |
|                     | 1:5120   | 0                           | 0    | 30*                         | 100* |
| <i>B. bigemina</i>  | 1:160    | 0                           | 0    | 0                           | 0    |
|                     | 1:320    | 0                           | 0    | 0                           | 0    |
|                     | 1:640    | 2                           | 6,9  | 0                           | 0    |
|                     | 1:1280   | 2                           | 6,9  | 0                           | 0    |
|                     | 1:2560   | 0                           | 0    | 0                           | 0    |
|                     | 1:5120   | 0                           | 0    | 30*                         | 100* |
| <i>A. marginale</i> | 1:320    | 1                           | 3,4  | 0                           | 0    |
|                     | 1:640    | 3                           | 10,3 | 0                           | 0    |
|                     | 1:1280   | 5                           | 17,2 | 0                           | 0    |
|                     | 1:2560   | 4                           | 13,8 | 0                           | 0    |
|                     | 1:5120   | 0                           | 0    | 30*                         | 100* |

Dados marcados com \* apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p \leq 0,025$ )

Com base nos resultados acima apresentados, a utilização de duas doses da vacina refrigerada e trivalente contra tristeza bovina mostrou ser mais eficiente que a vacina congelada com uso de glicerol apresentada por Sacco *et al* (2001) que obteve títulos na RIFI mais baixos para os três agentes.

#### 4.4 Custo x benefício

Há mais de 100 anos é sabido e documentado por toda a comunidade científica internacional que o carrapato causa perdas e danos aos bovinos em diversas regiões do globo terrestre. Somente no Estado do Rio Grande do Sul, em um estudo realizado por Horn & Arteché (1985), calculou-se que a infestação por carrapatos mata 136.084 bovinos por ano e 154.843 terneiros deixam de nascer.

Infelizmente, métodos empíricos de tratamentos contra o carrapato bovino, moscas dos chifres e prevenção contra tristeza bovina ainda são utilizados no Estado do Rio grande do Sul assim como em todo o Brasil. Muitas vezes, essas técnicas, são estimuladas por produtores, veterinários e pesquisadores, inclusive.

Apesar de termos centenas de publicações nacionais e internacionais comprovando todos os malefícios da presença de carrapatos nos bovinos, o “carrapateamento” ainda é muito estimulado em nosso País, submetendo os animais a infestações incontroláveis que, na prática em nível de campo, resultam em perdas cientificamente comprovadas (SMITH & KILBORN, 1893; ALMEIDA *et al* 2006; PEREIRA, 2008).

Para o cálculo dos custos dos dois grupos, foram levados em consideração somente os gastos com medicamentos e a morte de animais (1 animal do grupo II) durante o período do experimento (nascimento-desmame com 8 meses) com base nos valores de mercado da época. O grupo I (vacinado) apresentou custo de R\$ 15,15 (quinze reais com quinze centavos) por animal e um total de R\$ 454,50 (quatrocentos e cinquenta e quatro reais com cinquenta centavos) para os trinta animais do lote. Para o grupo II (controle) o custo por animal foi de R\$ 2,41 (dois reais com quarenta e um centavos) por animal e um total de R\$ 72,30 (setenta e dois reais com trinta centavos) para o lote inteiro. Deve ser somado ao custo por animal o valor do animal que morreu por anaplasmoses durante o experimento portanto, o peso do animal era 204,93 Kg multiplicado pelo valor de mercado do Kg vivo do terneiro (R\$ 3,50) resulta em R\$ 717,25 (valor do animal que morreu). R\$ 717,25 divididos pelos 30 animais do lote resulta em R\$ 23,90/animal. R\$ 23,90 soma-se aos R\$ 2,41 (custo por animal). Portanto o custo por animal no grupo II durante o experimento foi de R\$ 26,31 (vinte e seis reais com trinta e um centavos). Neste grupo não foram computados os custos dos tratamentos dos animais que apresentaram miíases por carrapateamento, diarreia por verminose e tratamento clínico da anaplasmoses.

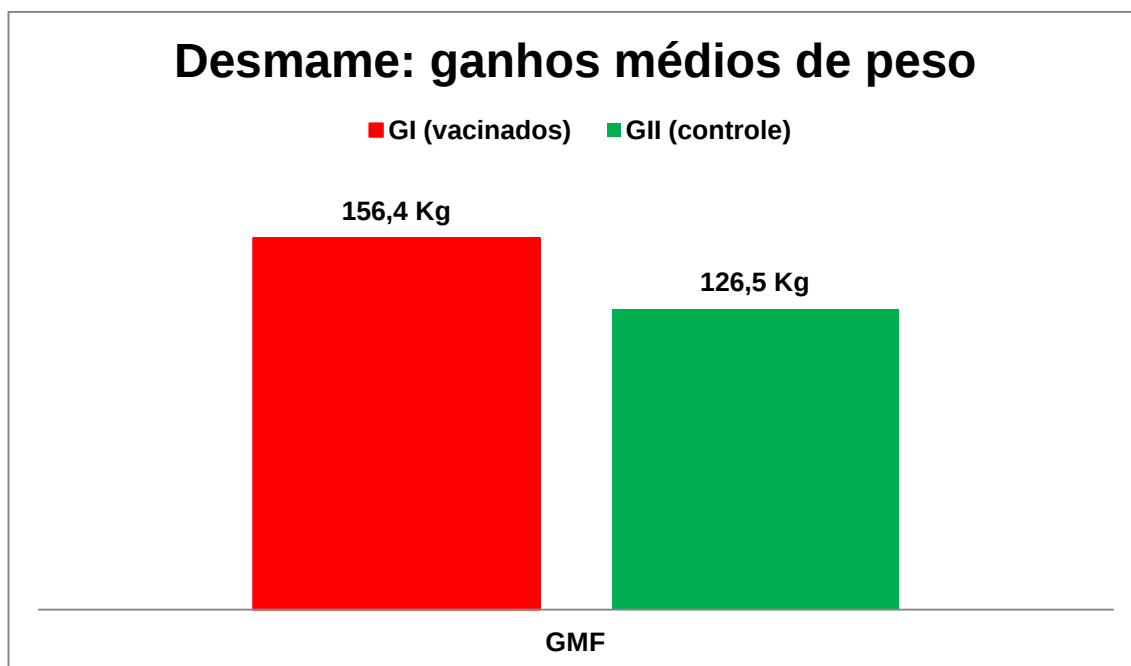


Figura 14 – Ganhos médios de peso por grupo ao final do experimento ( $p \leq 0,025$ ).

O grupo I (vacinado) apresentou um peso final (desmame) médio de 30,5 Kg a mais que o grupo controle ( $p \leq 0,025$ ), o que corresponde a um lucro bruto por animal de: 30,5 Kg X R\$ 3,50 Kg vivo = R\$ 106,75. Subtraindo-se o custo com os tratamentos por animal (R\$ 15,15) o lucro líquido foi de R\$ 91,60 (noventa e um reais com sessenta centavos) por animal e o lucro líquido do lote foi de R\$ 3.202,50 – 454,50 = R\$ 2. 748,00 (dois mil, setecentos e quarenta e oito reais) a mais que o grupo controle.

A fig. 14 mostra os ganhos médios de peso dos dois grupos durante o experimento ressaltando a significativa diferença de ganho do grupo vacinado.

Como os animais do grupo I (vacinados) nunca foram espoliados por carrapatos e moscas dos chifres, os benefícios vão além do ganho de peso como: bem estar, melhor aproveitamento dos alimentos, menos manejo com tratamentos, menor estresse por parasitismo direto e movimentação dos animais, garantia de imunidade segura e duradoura contra os três agentes da tristeza bovina, possibilidade de venda dos animais para qualquer região do Brasil, abertura de novos mercados e agregação de valor com seguro de vida.

## 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho pôde-se concluir, com base nos resultados obtidos, que:

- A utilização de vacina refrigerada para a prevenção dos três agentes da tristeza bovina, seguindo o protocolo proposto, é mais eficiente e econômica do que o manejo tradicional avaliado.
- A imunidade conferida pelo parasitismo por carrapatos é baixa, não homogênea para os três parasitos, o que permite o surgimento de doença.
- O “carrapateamento” como método de prevenção da tristeza bovina, além de ser ineficiente, gera estresse, causa baixo ganho de peso, abre portas para outras infecções, intoxicações (saliva do carrapato) e parasitos (miíases), maior manejo com os animais, altos custos com tratamentos clínicos e mortes.
- A utilização de duas doses com intervalo de sessenta dias da vacina viva atenuada e refrigerada mostrou ser altamente segura e economicamente rentável na prevenção da babesiose e anaplasmose.

## 6 REFERÊNCIAS

ABDALA, A.A., PIPANO, E. AGUIRRE, D.H *et al.* Frozen and fresh *Anaplasma centrale* vaccines in the protection of cattle against *Anaplasma marginale* infection. **Revue Élev Med Vet Pays Trop**, v.43, n.2, p.155-158, 1990.

ABOYTES-TORRES, R., BUENING, G.M. Development of a recombinant *Anaplasma marginale* DNA probe. **Veterinary Microbiology**, v.24, p.391-408, 1990.

ADVALDO H. Fonseca: Tristeza Parasitária Bovina-TPB. Disponível em: <[http://adivaldofonseca.vet.br/2011/wp-content/uploads/3\\_tristeza\\_parasitaria\\_bovina\(1\).pdf](http://adivaldofonseca.vet.br/2011/wp-content/uploads/3_tristeza_parasitaria_bovina(1).pdf)>. Acesso em 13 jul. 2011.

AGUIRRE, D.H., BERMÚDEZ, A.C., MANGOLD, A.J., GUGLIELMONE, A.A. Infección natural com *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en bovinos de raza Hereford, Criolla y Nelore en Tucumán, Argentina. **Revista de Medicina Veterinária**, v.71, n.2, p.54-60, 1990.

AGUIRRE D.H., GAIDO A.B., VINABAL A.E., ECHAIDE S.T. DE, GUGLIELMONE A.A. & DE ECHAIDE S.T.. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. **Parasite** v.1, n.4, p. 405-407, 1994

ALLRED, D. R.; AL-KHEDERY, B. Antigenic variation and cytoadhesion in *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*: different logics achieve the same goal. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 134, n. 1, p. 27-35, 2004.

ALMEIDA, M.B. de; TORTELLI, F.P.; CORREA, B.R.; FERREIRA, J.L.M.; SOARES, M.P; FARIAS, N.A.R.; CORREA, F.R.; SCHILD, A.L. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. **Pesq. Vet. Bras.** 26(4):237-242, out./dez. 2006.

ARAÚJO, F.R., MADRUGA, C.R., LEAL, C.R.B., SCHENK, M.A.M., KESSLER, R.H., MARQUES, A.P.C., LEMAIRE, D.C. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. **Veterinary Parasitology**, v.74, p.101-108, 1998.

ARTECHE, C.C.P. Contribuição ao estudo do combate ao *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888) no Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"**, Porto Alegre, n.1, p.74-80, 1972.

ARTECHE, C.C.P. Curso extraordinário sobre biologia dos carrapatos e testes carrapaticidas. Santa Maria: UFSM. 16p. 1975.

ARTECHE, C.C.P. Controle do carrapato dos bovinos no Rio Grande do Sul. In: **SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE PARASIToses DOS BOVINOS**, 1., P.231-249. 1979.

ARTECHE, C.C.P. Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil: uso de cepas atenuadas de *Babesia* spp e de cepa heteróloga da *Anaplasma*. **A Hora Veterinária**, v.11, p.39-42, 1992.

ARTECHE, C.C.P. Tristeza parasitária dos bovinos: retrospectiva e evolução. **A Hora Veterinária**, n. 125, 2002.

ARTECHE, C.C.P.; ARTECHE, A.C.M. Vacina, o fim da tristeza parasitária bovina. **A Hora Veterinária**, ano 23, n.137, jan/fev, 2004.

BABÈS, M.V. Sur l'hémoglobinurie bactérienne des boeufs. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences**, Paris, v.107, p.692-694, 1888.

BARBET, A.F. Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**. 57: 43-49. 1995.

BASSENGER, R., SCHOEMAN, J.H. Serological response of cattle to infection with *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in Southern Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.50, n.2, p.115-117, 1983.

BELTRAN, L.C. Características de La campaña nacional mexicana contra La garrapata. In: **WORKSHOP ON ECTOPARASITES**, Cali, 1975, CIAT, PP. 77-96 (Séries CE-13), 1977.

BENAVIDES, M. V.; SACCO, A. M. S. Differential *Bos taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, n. 1-2, p. 54-64, Nov. 2007.

BERGUE DE GRILLO TORRADO, C.E. La garrapata común del vacuno; SUS problemas. **Revista de Medicina Veterinaria**, Buenos Aires, v.50, n.6, p.387-395, 1976.

- BIDWELL, D.E., TURP, JOYNER, L.P., PAYNE, R.C., PURNELL, R.E.  
Comparisons of serological tests for *Babesia* in British cattle. **Veterinary Records**, v.103, p.446-449, 1978.
- BOCK, R.E., de VOS, A.J., Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. **Aust. Vet. J.** 79, 832–839. 2001.
- BOCK, R.; JACKSON, L.; de VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**. v. 129, p. 247-269. 2004.
- BÖSE, R., JORGENSEN, W.K., DALGLIESH, R.J., FRIEHOFF, K.T., De VOS, A.J.  
Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.61-74, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Secretária Nacional de Defesa Sanitária Animal.  
Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. **Boletim de Defesa Sanitária Animal**. n. especial , p. 83, 1983.
- BRINKMAN, B. S.; KERSTING, K. W. Bovine anaplasmosis: an overview. **Iowa State University Veterinarian**, v.52, n.1 , 1990.
- BROWN, W.C., SHKAP V., ZHU D, McGUIRE T.C., TUO W., Mc ELWAIN T.F. & PALMER G.H.. CD4+ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. **Infect. Immun.** 66.5406-5413. 1998a.
- BROWN, W.C. Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 9, p. 4130-4136, sept. 1998.
- BROWN, W.C.; PALMER, G.H. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 7, p. 275-281, 1999.
- BROWN W.C., Palmer G.H., LEWIN H.A. & McGUIRE T.C. CD4+ T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among satrains. **Infect. Immun.** 69.6853-6862. 2001b.
- BROWN, W. C.; NORIMINE, J.; GOFF, W.L.; SUAREZ, C.E.; McELWAIN, T.F.  
Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 315-327, 2006a
- BROWN, W. C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D.P.; GOFF, W.L. Immune control of *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 75-87. 2006b.
- CALLOW, L.L.; McGAVIN, M.D. Cerebral babesiosis due to *Babesia argentina*. **Australian Veterinary Journal**. v. 39, p. 15-21, 1963.

CALLOW, L.L. & MELLORS, L.T. A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomized calves. **Aust. Vet. J.**, 42:464-5, 1966.

CALLOW, L.L., MCGREGOR, W., PARKER, R.J., DALGLIESH, R.J. Immunity of cattle to *Babesia bigemina* following its elimination from the host, with observations on antibody levels detected by the indirect fluorescent antibody test. **Australian Veterinary Journal**, v.50, n.1, p.12-15, 1974.

CALLOW, L. Vaccination against bovine babesiosis. s.1., **Queensland Department of Primary Industries**, 48p. 1978.

COMMINS, M.A., GOODGER, B.V., WATISBUHL, D.J., WRIGHT, I.G. *Babesia bovis*: studies of parameters influencing microvascular stasis os infected erythrocytes. **Research in Veterinary Science**, v.44, p.226-228, 1988.

CONNEL, M.; HALL, W.T.K. Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, V48,p.477,1972.

CURNOW, J.A., CURNOW, B.A. An indirect haemagglutination test for the diagnosis of *Babesia argentina* infection in cattle. **Australian Veterinary Journal**,v.43, p.286-290, 1967.

CURNOW, J.A. The use of a slide agglutination test to demonstrate antigenic differences between *Babesia bigemina* parasites. **Australian Veterinary Journal**, v.49, n.6, p.290-293, 1973.

ESTES D.M., CLOSER N.M. & ALLEN G.K. IFN- $\gamma$  stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti-m and mitogen. **Cell. Immunol.** 154. 287-295. 1994.

ESTES, D.M.; BROWN, W.C. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** v.90, p. 1-10, 2002.

EWING, S.A. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. P.395-423. In: R.J. Hidalgo and E.W. Jones (ed), **Proceedings of the 7<sup>th</sup> Nacional Anaplasmosis Conference**. Mississippi State University, Mississippi State, 1981.

FAJARDO, F. A piroplasmose bovina no Rio de Janeiro. **Revista Médica**, São Paulo, T.4, n.18 – 30 set. 1901.

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

FARIAS, N.A.R. Tristeza Parasitária Bovina In: **Doenças de ruminantes e eqüinos**. CORREA, F.R; SCHILD, A.L. MÉNDEZ, M.C. p. 349-356. 1998.

FOIL, L.D. Tabanids as vectors of disease agents. **Parasitol. Today** 5:88-96, 1989.

FONSECA, A. & BRAGA, A. **Noções sobre tristeza parasitária dos bovinos.** Oficinas Typográficas do Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro, 216p. 1923.

FRANCIS, J. Resistance of zebu and other cattle to tick infestation and babesiosis with special reference to Australia: an historical review. **The British Veterinary Journal**, v.122, p.301-307, 1966.

FRIEDHOFF, K. T.; SMITH, R.D. Transmission of *Babesia* by ticks. In: RISTIC, M., KREIER, J.P. **Babesiosis.** New York: Academic Press, Inc.. Cap. 9, p.267-321. 1981.

FRIEDHOFF, K.T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man.** Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. Cap. 2, p. 23-52. 1988.

GALE K.R., LEATCH G., Gartside M. & Dimmock C.M. *Anaplasma marginale*: failure of será from immune cattle to confer protection in passive-transfer experiments. **Parasitol. Res.** 78.410-415.1992.

GOFF, W.L.; JOHNSON, W.C.; PARISH, S.M.; BARRINGTON, G.M.; TUO, W.; VALDEZ, R.A. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- $\gamma$  and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 463-471, 2001.

GOFF, W.L.; JOHNSON, W.C.; PARISH, S.M.; BARRINGTON, G.M.; ELSASSER, T.H.; DAVIS, W.C.; VALDEZ, R.A. IL-4 and IL-19 inhibition of IFN- $\gamma$  and TNF-dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.84, p. 237-251, 2002.

GOLDMAN, M., PIPANO, E., ROSENBERG, A. S. Fluorescent antibody tests for *Babesia bigemina* and *Babesia berbera*. **Research in Veterinary Science**, v.13, p.77-81, 1972.

GOMES A. **O carrapato do boi *Boophilus microplus*: ciclo, biologia, epidemiologia, patogenia e controle.** In **Carrapato, tristeza parasitária e tripanosoma dos bovinos.** CNPGC – Campo Grande, MS. 1998.

GOMES, C.C.G. **Comunicação pessoal.** EMBRAPA Campos do Sul. Laboratório de Hemoparasitologia. Bage. RS. 2011.

GONZÁLES, E.F. ; TODOROVIC, R.A. ; THOMPSON, K. C. Immunization against Anaplasmosis and Babesiosis: Part I. Evaluation of Immunization Using Minimum Infective Doses under laboratory Conditions. **Tropenmed. Parasitol.** , 27, p427-437 , 1976.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi.** UPF editora, Universidade de Passo Fundo-RS, 128 p., 2003.

GRISI, L. ; MASSARD, C. L. ; MOYA BORJA, G.E. ; PEREIRA , J. B. Impactos econômicos dos principais ectoparasitas em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21 n. 125, p.;8-10, 2002 .

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

HOPE, M.; RIDING, G.; MENZIES, M.; COLDITZ, I.; REVERTER, A.; WILLADSEN, P. Potencial for recombinant *Babesia bovis* antigens to protect against a highly virulent isolate. **Parasite Immunology**, v. 27, p. 439-445, 2005.

HORN, S.C.; ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.4, n.23, p. 13-32, 1985.

JOHNSTON, L.A., TAMMEMAGI, L. Bovine babesiosis: duration of latent and immunity to *Babesia argentina*. **Australian Veterinary Journal**, v.45, p.445-449, 1969.

JOHNSTON, L.A.Y., PEARSON, R.D. LEATCH, G. Evalution of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Babesia argentina* infection in cattle. **Australian Veterinary Journal**,v.49, n.8, p.373-377, 1973.

JOHNSTON, L.A.Y., LEATCH,G., JONES, P.N. The duration of latent infection and functional immunity in Droughtmaster and Hereford cattle following natural infection with *Babesia argentina* and *Babesia bigemina*. **Australian Veterinary Journal**, v.54, n.1, p.14-18, 1978.

JONES,T.C.; HUNT,R.D.; KING,N.W. **Patologia Veterinária** 6ªed., Ed Manole, p.405-408,1997.

KAHL, L.P., ANDERS, R.F., CALLOW, L.L., RODWELL, B.J., MITCHELL, G.F. Development of a solid-phase radioimmunoassay for antibody to antigens of *Babesia bovis* infected bovine erythrocytes. **International Journal for Parasitology**, v.12, n.2-3, p.103-109, 1982.

KERR, M.G. **Exames laboratoriais em Medicina Veterinária**. 2ªed, Editora ROCA, São Paulo, 436 p. 2003.

KESSLER, R.H.; MADRUGA, C.R.; JESUS, E.F. e SEMPREBOM, D. V. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, 22 (7): 747-752, jul. 1987 a.

KESSLER, R.H.; SACCO, A.M.S.; JESUS, E.F. e MADRUGA, C.R. Desenvolvimento de cepas vivas atenuadas de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*: teste preliminar. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, 22 (11/12): 1225-1230, Nov./dez. 1987 b.

KESSLER, R.H., SASTRE, A.M., MOREIRA, M.A., *et al.* Experiencias con vacunas vivas atenuadas de *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma centrale* conservadas

por congelación en Brasil. **Revista Cubana de Ciências Veterinárias**, v. 22, n. 3, p. 189-196, 1991.

KESSLER, R.H., SCHENK, M.A.M., MADRUGA, C.R., SACCO, A.M.S., MIGUITA, M. Tristeza Parasitária dos Bovinos (TPB). In: CHARLES, T.P., FURLONG, J. **Doenças parasitárias dos Bovinos de Leite**. Coronel Pacheco, MG: EMBRAPA-CNPGL. p.1-30. 1992.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M.A.M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. EMBRAPA-CNPGL-Campo Grande. 1998.

KESSLER, R.H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.4, p. 177-179, out./Dez.,2001

KESSLER, R. H. ; SOARES, C. O. ; MADRUGA, C. R. ; ARAÚJO, F.R. Tristeza Parasitária dos Bovinos : Quando vacinar é preciso. Campo Grande , **EMBRAPA , Documentos 131** , 2002.

KOCAN K.M., STILLER D., GOFF W.L, EDWARDS W.E., WICKWIRE K.B., STICH R.W., YELLIN T.N., EWING S.A., PALMER G.H., BARRON S.J., HAIR J.A. & MCGUIRE T.C. The developmental cycle of *Anaplasma marginale* in *Dermacentor* spp. **Proc. 8<sup>th</sup> Nat. Vet. Hemoparasite Disease Conf.**, St. Louis, p.149-160, 1989.

KOCAN K. M., FUENTE, J., EDMOUR F. BLOUIN A, JOHANN F. COETZEE C, EWING, S.A. The natural history of *Anaplasma marginale* Article in Press. **Veterinary Parasitology**. Elsevier – 2009.

KUTTLER, K.L., ADAMS, L.G., TODOROVIC, R.A. Comparations of the complement-fixation and indirect fluorescent antibody reactions in the detection of bovine *Babesia*-SIS. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, n.2, p.153-156, 1977.

KUTTLER, K.L. World-wide impact of babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton, Florida, p.1-22. 1988.

LEEFLANG, P., PERIÉ, N.M. Comparative immunofluorescent studies on 4 *Babesia* species of cattle. **Research in Veterinary Science**, v.13, p.342-346, 1972.

LEVINE, N.D. Blood parasites: the piroplasms. In: LEVINE, N.D. **The Protozoan Phylum Apicomplexa**, Boca Raton, Flórida: CRC Press, Inc., v.2, cap.13, p.35-45. 1988.

LEVY, M.G., CLAUBAUGH, G., RISTIC, M. Age resistanc in bovine babesiosis: role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. **Infection and Immunity**, v.37 n.3, p.1127-1131, 1982.

LITTLE, D.A. & FRANCIS, J. Resistance of drought master cattle to tick infestation and babesiosis, **Australian Veterinary Journal**, v.40, n.7, p.247-253, 1964.

LÖHR, K.F., ROSS, J.P.J. A capillary tube-agglutination test for the detection of *Babesia bigemina* antibodies. **Zeitschrift Tropenmedizin Parasitologie**, v.20, p.287-292, 1969.

LOMBARDO, R. A. Socioeconomic importance of the tick problem in the Americas. **Pan American Health Organization Scientific Publication**, v. 316, p. 79-89, 1976.

LOPEZ, V.G., TODOROVIC, R.A. Rapid latex agglutination (RLA) test for the diagnosis of *Babesia argentina*. **Veterinary Parasitology**, v.4, n.1, p.1-9, 1978.

LUCENA, R.B.; PIEREZAN, F.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, F.; FIGHERA, R.A.; BARROS, C.S.L. Doenças de Bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. **Pesq. Vet. Bras.** Vol.30, n.5, Rio de Janeiro, maio 2010.

MACHADO, P.R.L.; ARAUJO, M.I.A.S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. In: Educação Médica Continuada. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MACHADO, R.Z. Emprego do ensaio imunoenzimático indireto (ELISA teste) no estudo da resposta imune humoral de bovinos importados e premunidos contra a tristeza parasitária. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.4, n.2, suplemento 1, p.217, 1995.

MADRUGA, C.R., BERNE, M.E.A., KESSLER, R.H., GOMES, R.F.C., LIMA, J.G., SCHENK, M.A.M. **Diagnóstico da tristeza parasitária bovina no Estado de Mato Grosso do Sul: inquérito de opinião**. Fundação Cargill, 40p. (EMBRAPA–CNPQC. Circular Técnica, n.18). 1986.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande – MS. P.229-233. 2001.

MAHONEY, D.F. The epidemiology of babesiosis in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.24, p.310-313, 1962.

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

MAHONEY, D. F. Babesiosis of cattle. **Australian Meat Research Committee**. v. 23, p. 1-21, 1973.

MAHONEY, D.F., KERR, J.D., GOODGER, B.V., MAHONEY, D.F. *Babesia* of domestic animals. In: **Parasitic Protozoa**. Ed. KREIER, J.P. Academic Press. New York. v.4, p.1-52, 1977.

MAHONEY, D.F., KERR, J.D., GOODGER, B.V., WRIGHT, I.G. The immune response of cattle to *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). Studies on the nature and specificity of protection. **International Journal for Parasitology**, v.9, p.297-306, 1979.

MARTINS, J.R.; CORRÊA, B.L.; CERESÉR, V.H.; ARTECHE, C.C.P.; GUGLIELMONE, A.A. Some aspects of the epidemiology of *Babesia bovis* in Santana do Livramento, Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, n. 2, p. 75-78, 1994.

MARTINS, J.R. Tristeza parasitária bovina. In: Carrapatos: problemas e soluções. **Embrapa Gado de Leite**, Juiz de Fora, p. 39-49, 2005.

McCOSKER, P. J. The global importance of babesiosis. In: RISTIC, M.; KREIER, J. P. **Babesiosis**. New York: Academic Press, p. 1-24. 1981.

McELWAIN, T.F., MISHRA, V.S., STEPHENS, E.B. Development of an antigenically defined vaccine against *Babesia bigemina*. In: Recent developments in the control of anaplasmosis, babesiosis and cowdriosis. In: WORKSHOP HELD AT ILRAD, 1991, Kenya. **Proceedings...** Nairobi: DOLAN, T.T. ILRAD, p. 105-112. 1992.

McGAREY D.J. & ALLRED D.R. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. **Infect. Immun.** 62. 4587-4593. 1994.

MELÉNDEZ, R.D.; BENITEZ, M.T.; NICCITA, G.; J. MORENO, J.; PUZZAR, S.; MORALES, J.. Humoral immune response and hematologic evaluation of pregnant Jersey cows after vaccination with *Anaplasma centrale*. **Veterinary Microbiology** 94. 335–339. 2003.

NARI, A. Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. **Veterinary Parasitology**. 57, 153–165. 1995.

O'DONOGHUE, P.J.; FRIEDHOFF, K.T.; VIZCAINO, O.G.; WEYRETER, H. The detection of IgM and IgG antibodies against *Babesia bigemina* in bovine sera using semi-defined antigens in enzyme immunoassays. **Veterinary Parasitology**, v. 18, yn. 1, p. 1-12, 1985.

PALMER G.H. & McGUIRE T.C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. **J. Immunol.** 133.1010-1015. 1984.

PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; DAVIS, W. C.; MCGUIRE, T. C. Immunization with an Isolate- Common Surface Proteins Protects Cattle Against Anaplasma. **Science**, v.231, p.1299-1302. 1986.

PALMER, G.H.; BARBET A.F.; CANTOR G.H. & McGUIRE T.C. Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. **Infect. Immun.** 57:3666-3669. 1989.

PALMER,G.H.; LINCOLN,S. Anaplasmosis . In SMITH,B.P. **Large Animal Internal Medicine**. 3ªed. C.35,p.1049-1051,Ed. Mosby, 2002.

PASSOS L.M. & LIMA J.D. Diagnóstico de anaplasmoze bovina congênita em Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.36 p.743-744, 1984.

PATARROYO, J.H.; VARGAS, M.I.; BICUDO, P.L. Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 11, p. 301-308, 1982.

PEREIRA, M.C, LABRUNA, M.B., SZABÓ, M. P. J., KLAFKE, G.M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Biologia, Controle e Resistência. **MedVet**. p. 15-53. 2008.

PIPANO, E.; MAYER, E & FRANK, M. **British Veterinary Journal**, 141, 174-178, 1985.

POTGIETER, F.T.; SUTHERLAND, B. and BIGGS, H.C. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*. Onderstepoort **J. Vet. Res.** 48:119-122. 1981.

PURNELL, R.E. In **Babesiosis**, RISTIC and KREIER eds. New York, Academic Press Inc., p.25-66, 1981.

PURNELL, R.E., BROCKLESBY, D.W., HENDRY, D.J., STARK. A.J., YOUNG, E.R. *Babesia divergens* in splenectomized calves: titration of the infective dose. **Research in Veterinary Science**, v.23, p.124-125, 1977.

RAYMOND, R.J., PALMER, G.H., KNOWLES, D.P. The Polymerase Chain Reaction: a new tool for detecting hemoparasitic diseases. ABN, USA, **Research Summary**, 1990.

RIBEIRO M.F.B., LIMA J.D., GUIMARÃES A.M., SCATAMBURLO M.A. & MARTINS N.E. Transmissão congênita da anaplasmoze bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.47,n.3, p.297-304,1995.

RIBEIRO, M.F.B. & PASSOS, L.M.F. Tristeza Parasitária Bovina . **Cadernos Técnicos de veterinária e zootecnia** , n.39 p.36-51, julho 2002.

RICHEY, E.J. Bovine anaplasmosis. In: HOWARD, R.J. **Current veterinary therapy-food animal practice** 4. p. 403-411. Philadelphia: W.C. Saunders, 1999.

RÍOS, L.G., AGUIRRE, D.H., GAIDO, A.B. Evaluación de la dinámica de la infección por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en terneros. Diagnóstico por microscopia directa y prueba de inmunofluorescencia indirecta. **Revista de Medicina Veterinária**, v.69, p.4-5, 1988.

RISTIC, M.; SIBINOVIC, S. and WELTER, C.J. An attenuated *Anaplasma marginale* vaccine, p. 56-69. In: **Proceedings of the 72<sup>nd</sup> Annual Meeting of the United States Livestock Sanitary Association**. 1968.

RISTIC,M. Bovine Anaplasmosis. In **Parasitic Protozoa**. Vol III. Ed. by Kreier, Academic Press, New York, San Francisco, London, 235-249, 1977.

RISTIC, M. Bovine anaplasmosis with emphasis on immune responses and protection (Summary), p.22. In: **Annals Symposium on the Use of Isotopes for Research and Control Vectors of Animal Diseases Host Pathogen Relationships and Enviromental Impactmof Control Procedures**. FAO, Viena, Italy. 1979.

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

ROGERS, R.J. Observations on the pathology of *Babesia argentina* infections in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 47, p. 242-247, 1971.

ROSS, J.P.J., LÖHR, K.F. Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. **Research Veterinary Science**. v.9, p.557-562, 1968.

SACCO, A.M.S. **Babesiose bovina: avaliação de diferentes imunógenos no processo de imunização de bovinos e da resposta humoral produzida, através da RIFI e ELISA**. Belo Horizonte, 1996. 257f. Tese (Doutorado em Parasitologia – Protozoologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

SACCO, A.M.S, KESSLER, R.,H., MADRUGA, C.R. Cepas atenuadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma centrale* como imunógenos no controle da tristeza parasitária bovina. **Ciencia Rural**, v.31, nº. 5, Santa Maria, set/out. 2001.

SACCO, A.M.S. Profilaxia da tristeza parasitária bovina: Por quê, quando e como fazer. **Circular Técnica, EMBRAPA-CPPSul**, Bagé, RS. ISSN 0100-8625, 2002.

SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F. et al. Enzymatic amplification of B-Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAMISH M., PIPANO E. & HADANI A. Intrastadial and interstadial transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus* ticks in cattle. **Am. J. Vet. Res.** V.54, n.3p.411-414,1993.

SANCHEZ, F.L., RUVALCABA, N.F., TORRES, R.A., ALARCON, G.J.C., SANCHEZ, I.E. Prevalencia de anaplasmosis y babesiasis y determinación de la probabilidad diaria de babesiasis en bovinos del municipio de Villa Comaltitlan, Chiapas. **Técnica Pecuária México**, v.48, p.92-97, 1985.

SCHENK, M. A. M.; KESSLER, R. H.; MIGUITA, M. ; HORNER, M. R. Desenvolvimento de cepas atenuadas de *Babesia bovis* , *babesia bigemina* e *Anaplasma centrale*: III. Teste crítico com bovinos brangus. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v 2 , n. 2,p.75-78, Agosto 1993.

SEBRAE/SENAR/FARSUL. **Diagnóstico de Sistemas de Produção de Bovinocultura de Corte do Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: SENAR, 265 pp. 2005.

SHODA, L.K.M.; PALMER, G.H.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; FLORINCHRISTENSEN, M.; GODSON, D.L.; BROWN, W.C. *Babesia bovis*-stimulated macrophages express interleukin-1<sub>α</sub>, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, 52 and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. **Infection and Immunity**. v.68, p. 5139-5145. 2000.

SMITH, T., KILBORNE, F.L. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or Southern Cattle fever. U. S. Department of Agriculture. Bureau of Animal Industry. **Bulletin nº 1**. Washington, Government Printing Office, 301p. 1893.

SMITH, R. Epidemiología de la anaplasmosis y babesiosis bovina. **Salud Animal, Publicación Científica** 1, p.267-278, 1982.

SOLANO, M. Babesiosis cerebral bovina. **Ciências Veterinárias**, VIII, 1, Costa Rica, 1986.

SOLARI, M. A.; NARI, A.; CARDOZO, H. Impact of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* on the production of beef cattle in Uruguay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, p. 143-149, Supplement III. 1992.

SOLORIO-RIVERA, J.L.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I. Epidemiología de la babesiosis bovina. I. Componentes Epidemiológicos. **Revista Biomédica**, v. 8, n. 1, p. 37-47, 1997a.

SOLORIO-RIVERA, J.L.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I. Epidemiología de la babesiosis bovina. II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. **Revista Biomédica**, v. 8, n. 2, p. 95-105, 1997b.

SINK, C.A., FELDMAN, B.F. **Urianálise e hematologia laboratorial para o clínico de pequenos animais**. Editora ROCA, São Paulo, 111 p. 2006.

SPÄTH, E.J.A., MANGOLD, A.J. Algunas características de producción y sanidad de rodeos de ganado bovino de carne en el Sudeste de Salta y norte de Tucumán. **Revista Argentina de Producción Animal**, v.6, n.1-2, p.101-112, 1986.

STICH, R.W.; SHODA, L.K.M.; DREEWEA, M.; ADLER, B.; JUNGI, T.W.; BROWN, W.C. Stimulation of nitric oxide production in macrophages by *Babesia bovis*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 9, p. 4130-4136, sept. 1998.

STILLER, D. Application of biotechnology for the diagnosis and control of ticks and tick-borne diseases. **Parasitology**, v.32, n. 1, p. 87-111, 1990.

STILLER, D & COAN, M. Recent developments in elucidating tick vector relationship for anaplasmosis and equine piroplasmiasis. **Veterinary Parasitology**. 57(1-3): 97-108. 1995

TAMURA, T., TAKAHASHI, K., SONODA, N. The indirect fluorescent test as a method for detecting antibody in dogs infected with *Babesia gibsoni*. **J. Coll. Dairying**, v.8, p.249-256, 1980.

TAYLOR, S.M. *Babesia* vaccines attenuated by blood passage and irradiation. In: WRIGHT, I. **Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines**. New York: CRC Press. p. 43-59. 1989.

TEBELE N., MCGUIRE T.C. & PALMER G.H. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. **Infect. Immun.** 59.3199-3204. 1991.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**. Elsevier. Cap. 20, p.263-277. 2009

THEILER, A., 1910. **Report of the Government Veterinary Bacteriologist 1908-** Department of Agriculture, Union of South Africa, pp. 6-64. 1909.

TODOROVIC, R.A., KUTTLER, K.L.A babesiasis card agglutination test. **American Journal of Veterinary Research**, v.35, n.10, p.1347-1350, 1974.

TODOROVIC, R.A., LONG, R.F. Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of *Babesia* spp. infections in Colombian cattle. **Tropenmed. Parasitol.**, v.27, p.169-181, 1976.

TUO W., PALMER G.H., MCGUIRE T.C., ZHU D. & BROWN W.C. Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Infect. Immun.** 68.270-280. 2000.

ULEVITCH, R. J.; MATHISON, J. C.; CORREIA, J. S. Innate immune responses during infection. **Vaccine**, v. 22S, p. 25-30, 2004.

VALEIRÓN, C. R. Autoanticorpos contra globulos rojos en hemoparasitosis. **Gazeta de Ciencias Veterinaria**, ano 4, n. 1. 1998.

VANZINI, V.R., RAMIREZ, L.M. Babesiosis y anaplasmosis bovina – diagnostico, epidemiologia y control. **Veterinária Argentina**, n.25, v.3, p.137-190, 1995.

VIANA, F.A.B. **Guia terapêutico veterinário**. 2ª Edição. Ed. CEM. p. 339. 2007.

VIEIRA, M.I.B., LEITE, R.C., SACCO, A.M.S., SILVA, J.G.C. Estratégias de controle do carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) e influência na estabilidade enzootica da babesiose bovina. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 12, 4, 139-144. 2003.

VISSER, E.S., AMBROSIO, R.E. DNA probes for the detection of *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 54, 623-627, 1987.

YOUNG, A.S., MORZARIA, S.P. Biology of *Babesia*. **Parasitology Today**, v.2, n 8, p.211-219, 1986.

WALTISBUHL, D.J., GOODGER, B.V., WRIGHT, I.G., COMMINS, M.A., MAHONEY, D.F. An enzyme linked immunosorbent assay to diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. **Parasitology Research**, v.73, p.126-131, 1987.

WEILAND, G., REITER, I. Methods for the measurement of the serological response to *Babesia*. In: RISTIC, M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, Inc., cap.9, p.143-162. 1988.

WHARTON, R.H.; ROULSTON, W. J. Acaricide resistance in *Boophilus microplus* in Australia. In: **WORKSHOP ON HEMOPARASITES**, Cali, 1975, CIAT, (Séries CE-12) p.73-92,1977.

WOODHAM, C.B.; GONZALES, O.A.; LOPEZ, L.A.; GUEREÑA, M. R. Progresos en la erradicación de lãs garrapatas *Boophilus* em Mexico 1960 – 1980. **Revista Mundial Zootecnica**, nº 48 FAO, Roma, Italia, 18-24 pp. 1983

WRIGHT, I.G. Studies on the pathogenesis of *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections in splenectomized calves. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.39, p.85-102, 1972.

WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V., McKENNA, R.V., MAHONEY, D.F. Acute *Babesia bovis* infections: a study of the vascular lesions in kidney and lung. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.60, p.19-27, 1979.

WRIGHT, I.G. Biochemical characteristics of *Babesia* and physicochemical reactions in the host. In: RISTIC, M., KREIER, J.P. **Babesiosis**. New York: Academic Press, Inc. cap. 6, p. 171-205. 1981.

WRIGHT, I.G., GOODGER, B.V. Pathogenesis of Babesiosis. In: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.. cap.6, p.99-118. 1988.

WRIGHT, I.G. Immunodiagnosis of and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp. and *Anaplasma* sp. in domestic animals. **Revue Scientifique et Technique**, Office International des Epizooties, v.9, n.2, p.345-356, 1990.

## ANEXO A

### **ERITROVAC<sup>®</sup>**

Vacina viva, atenuada e refrigerada contra *Babesia bovis*,  
*Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*

#### **(USO VETERINÁRIO)**

**ERITROVAC<sup>®</sup>** é uma vacina que contém amostras atenuadas dos agentes das Babesioses e uma amostra heteróloga de *Anaplasma*, destinado à imunização contra *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*. Foi criada e aperfeiçoada pelo **Dr. Carlos C. P. Arteche em 1987**, sendo pioneira e única no Brasil.

#### **COMPOSIÇÃO**

Vacina composta por eritrócitos bovinos parasitados por cepas puras, de parasitos vivos, atenuados, perfeitamente controlados e livres de quaisquer doenças infecciosas, em quantidade suficiente para promover imunidade.

#### **INDICAÇÕES**

**ERITROVAC<sup>®</sup>** é indicada para bovinos com idade entre 2 e 10 meses para prevenção da Tristeza Parasitária Bovina (TPB), ou seja, imunização de bovinos contra a *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*.

#### **CONTRA - INDICAÇÕES**

-Qualquer categoria animal que não tenha idade entre 2 e 10 meses na primo vacinação.

-Animais adultos que não tenham sido previamente primo vacinados com duas doses, com idade entre 2 e 10 meses.

-Animais anêmicos, desnutridos, estressados, doentes, convalescentes ou com carrapatos.

-Vacas prenhes, lactação ou ordenha.

-Tratamento clínico da TPB ou durante surtos da doença.

- Touros durante a temporada reprodutiva.

#### **DOSE E VIA DE APLICAÇÃO**

A dose recomendada é de 3 mL (três mililitros), por via subcutânea (SC) no pescoço.

#### **ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES**

- Cuidar para que os animais estejam corretamente vacinados contra as doenças mais comuns da região.

- Fazer tratamento anti-helmíntico prévio, mesmo que seja no dia da inoculação, principalmente considerando a *Fasciola hepatica*.

- Não programar serviços com os animais inoculados até o final do período de controle (vide reações esperadas). Mantê-los sempre que possível no mesmo potreiro de origem.

- Observar que estejam em potreiro com boa pastagem, água limpa, sombra e sal mineralizado 60 ou 80 P à vontade.

- Manter os animais livres de carrapatos e moscas-dos-chifres desde 20 dias antes da data da primeira dose até 40 dias após a segunda dose.

- Após a primeira dose, os animais não poderão sofrer qualquer tratamento ou manejo, sem a orientação do Médico Veterinário responsável.

#### **INSTRUÇÕES DE USO**

Segurando pelo gargalo, o frasco deverá ser agitado suavemente, com movimentos circulares, até que todo o depósito do fundo tenha sido removido. Isto evita a hemólise e perda do princípio ativo.

- Primo vacinação: composta de duas doses com intervalo de 60 dias.

a) A partir do 2º mês de vida, pelo menos 60 dias antes do desmame ou a partir de 20 dias após.

b) Sessenta dias antes de transferir animais de zonas livres de carrapatos ou marginais para zonas infestadas.

b) Reforço: cada 12 meses, contando da primeira dose.

c) 60 dias antes de qualquer alteração de manejo que possa desencadear um quadro de estresse nos animais.

d) Os animais somente estarão totalmente protegidos, após receberem a 1ª e a 2ª dose da vacina.

#### REAÇÕES ESPERADAS

Por tratar-se de um produto que veicula unidades biológicas vivas, embora atenuadas, é INDISPENSÁVEL QUE A VACINAÇÃO SEJA FEITA SOB A RESPONSABILIDADE DE UM MÉDICO VETERINÁRIO. Os animais inoculados reagem (resposta imune) à presença dos parasitos na primo vacinação. Podem apresentar elevação de temperatura (não síndrome febre), mas raramente mostram outros sinais. Essas reações podem variar em função da idade, nível de estresse, da suscetibilidade individual, do estado nutricional, da saúde e experiência prévia com hematozoários e carrapatos. Do 6º ao 20º dia após a primeira dose, os animais deverão ser inspecionados diariamente a campo, tratando-se apenas os que apresentarem sintomas nítidos de TPB (Isto indica que os animais já estavam contaminados por cepas de campo e não da vacina). O maior número de reações vacinais acontece entre o 8º e o 15º dias, pós-vacinação. Nesse período estarão reagindo as Babesias e, por isso, o tratamento, quando necessário, deverá ser com a metade da dose de um babesicida eficaz, à base de diamidina. Do 30º ao 50º dia após a vacinação, acontecem as reações ao Anaplasma. Nesse período, também os animais vacinados deverão ser inspecionados diariamente a campo. O controle das reações deve ser feito com produto à base de clortetraciclina (metade da dose de bula) e antitérmico. Não utilizar tetraciclina de efeito prolongado (LA) ou imidocarb. O *Anaplasma*

*centrale* protege o bovino vacinado contra a morte por *A. marginale*, mas nem sempre contra a doença. Portanto, mesmo animais imunizados poderão sofrer uma anaplasiose que será sempre benigna e de fácil controle.

#### “ESTA VACINA NÃO CAUSA TPB CLÍNICA”

#### PRAZO DE VALIDADE E ARMAZENAMENTO:

**ERTROVAC®** tem validade por SETE dias, após a sua data de fabricação, escrita no frasco, e deverá ser conservada sob refrigeração entre 2º e 8º C, sempre ao abrigo da luz solar direta

#### APRESENTAÇÃO

Frascos com oitenta e quinze doses.

**Venda sob prescrição e orientação do Médico Veterinário.**

**REGISTRO NO MAPA: nº 3.377/90 em 22/05/90**

#### LABORATÓRIO HEMOPAR LTDA.

CNPJ: 10501247/0001-45

I.E.: 1060137418

Rua Rivadávia Corrêa, 1309 - Centro

Santana do Livramento – RS

CEP.: 97.573-011

Fone/FAX: 55-32425224

SAC: [WWW.hemopar.com.br](http://WWW.hemopar.com.br)

