

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**SOROEPIDEMIOLOGIA DA *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*,  
*Anaplasma marginale* E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO *Trypanosoma vivax*  
EM GADO LEITEIRO DA REGIONAL DE PEDREIRAS – MA.**

Ana Caroline Ericeira Barros

São Luís - MA  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA CAROLINE ERICIERA BARROS

**SOROEPIDEMIOLOGIA DA *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*,  
*Anaplasma marginale* E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO *Trypanosoma vivax*  
EM GADO LEITEIRO DA REGIONAL DE PEDREIRAS – MA.**

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre  
em Ciências Veterinárias

**Área:** Sanidade Animal

**Orientadora:** Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta

São Luís  
2009

Barros-Ericeira, Ana Caroline

Soroepidemiologia de *babesia bovis*, *babesia bigemina*, *anaplasma marginale* e diagnostico molecular do *trypanosoma vivax* em gado leiteiro da regional de Pedreira-MA / Ana Caroline Ericeira Barros. - São Luis, 2009.

112f.

Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Maranhão, 2009.

Orientadora: Profa. Ana Lucia Abreu Silva

1.Babesiose 2.Anaplasnose 3.Tripanossomiase 4.Elisa  
5.PCR 6.Maranhão I.Titulo

CDU: 619:616.993.19

Dedico essa obra com todo o meu amor a meus pais  
Maria de Fátima Ericeira Barros e Valdevino Jesus Barros,  
a meu irmão Carlos Eduardo Ericeira Barros e  
a meu afilhado Alexandre Reges Trindade da Silva.

## **AGRADECIMENTOS**

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

A toda minha família pelo estímulo, apoio e compreensão.

A Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva por ter entendido minhas dificuldades, e especialmente por me ensinar com atitudes e palavras que a ética e a responsabilidade são características essenciais em qualquer profissional.

A Profa. Dra. Alcina Vieira de Carvalho Neta por minha apresentação à biologia molecular e pelas 'dicas' de quem tem um pouquinho mais de experiência.

A Profa. Dra. Celeste da Silva Freitas de Souza pela disponibilidade e incentivo científico.

Ao Prof. Dr. Fábio Henrique Evangelista de Andrade pela dedicação e estímulo aos trabalhos laboratoriais.

A Carlos Henrique Araújo Pontes que pelo companheirismo e carinho sempre recarregou minhas energias quando tudo estava muito difícil.

A Solange de Araújo Melo que pela amizade, conselhos e idéias, foi como uma irmã neste tão pouco tempo de convivência.

A Caroline Romão e Patrícia Viana, "nossas babás", pela amizade e cuidado a mim dispensados desde o início do mestrado.

Ao querido casal de amigos Liza Margareth Medeiros de Carvalho Sousa e Uiran Sousa por terem disponibilizado a sua casa durante o período que passei em São Paulo.

Aos meus estimados colegas de turma do Mestrado: Francisco, Vivian, Esperança, Iran, Ana Maria, Daniela, Nancyleni, Rosany, por nossa convivência e pelas festinhas divertidas de encerramento das disciplinas. Em especial a Sâmia Clara por ter dividido comigo os bons e não tão bons momentos em São Paulo.

As minhas amigas pós-graduandas: Joyce, Elba, Joicy “caloura”, Andréa, Nádia, Francisca Andréia pela amizade e intermináveis momentos de descontração.

A Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa pela oportunidade de participar do projeto PROCAD I Amazônia/CAPES.

Aos alunos da graduação Marllon Breno Lima e Vanézia Duarte pelo auxílio nos exames microscópicos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pela bolsa de estudos concedida.

**MUITO OBRIGADA!!**

“Digno de admiração é aquele que tendo tropeçado ao dar o primeiro passo, levanta-se e segue em frente”.

(Carlos Fox)

## SUMÁRIO

<b>1.1 Capítulo 1: Introdução</b> .....	13
Revisão de Literatura .....	14
<i>Babesia</i> spp.....	14
<i>Anaplasma marginale</i> .....	21
<i>Trypanosoma vivax</i> .....	27
Diagnóstico.....	37
<b>1.2 Capítulo 2: Artigo 1: Serological survey of <i>Babesia bovis</i>, <i>Babesia bigemina</i> and <i>Anaplasma marginale</i> in cattle from Pedreiras Basin, Maranhão State, Brazil.</b> .....	45
<b>1.3 Capítulo 3: Artigo 2: Diagnóstico parasitológico e molecular do <i>Trypanosoma vivax</i> na regional de Pedreiras, Maranhão, Brasil</b> .....	58
<b>1.4 CONCLUSÕES</b> .....	73
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
<b>Anexos</b> .....	101

## Lista de Tabelas

Table 1 - Frequency of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from Pedreiras Basin – Maranhão State/Brazil.....58

Table 2 – Frequency of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* antibodies by sex, age group and breed in cattle from Pedreiras Basin – Maranhão State/Brazi.....59

## Lista de Figuras

Figura 01. Esfregaço de sangue bovino oriundo da regional de Pedreiras-MA, evidenciando forma tripomastigota de *Trypanosoma vivax* (seta). Coloração GIEMSA, objetiva de 40X.....73

Figura 02. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Trypanosoma vivax* pelas técnicas de PCR 1-Marcador de peso molecular; 2- Controle positivo; 3- Controle negativo; 5, 6, 7, 9 - Amostras positivas.....74

## RESUMO

BARROS-ERICEIRA, Ana Caroline, M.S. Universidade Estadual do Maranhão, junho de 2009. **Soroepidemiologia da *Babesia bovis*, *Babesia Bigemina*, *Anaplasma marginale* e diagnóstico molecular do *Trypanosoma vivax* em gado leiteiro da regional de Pedreiras – MA.** Orientadora: Ana Lucia Abreu Silva. Co-orientadora: Alcina Vieira de Carvalho Neta.

O presente trabalho tem por objetivo realizar o estudo soroepidemiológico da babesiose e anaplasnose bovina e diagnosticar o *Trypanosoma vivax* por meio de exame parasitológico e molecular em bovinos leiteiros da regional de Pedreiras. A detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* foi realizado pelo método do ELISA indireto. Um total de 158 amostras de sangue foram coletadas, este número foi determinada por um modelo matemático. Utilizando exame parasitológico e molecular, amostras de 177 animais foram obtidas de vinte fazendas distribuídas em quatro municípios que compõem a regional para pesquisa de tripanossomíase. Os resultados mostram que a soroprevalência da babesiose e anaplasnose é altíssima na regional de Pedreiras e se constitui uma área de estabilidade enzoótica. Por outro lado, a tripanossomíase apresentou baixos índices de positividade tanto no exame parasitológico quanto no PCR. Entretanto, a técnica da PCR foi mais sensível que o exame parasitológico. Conclui-se que na área estudada, as hemoparasitoses direta ou indiretamente causam prejuízos econômicos.

Palavras-chaves: babesiose, anaplasnose, tripanossomíase, PCR, ELISA e Maranhão

## ABSTRACT

BARROS-ERICEIRA, Ana Caroline, M.S. Universidade Estadual do Maranhão, junho de 2009. **Seroepidemiology of *Babesia bovis*, *Babesia Bigemina*, *Anaplasma marginale* and molecular diagnosis of *Trypanosoma vivax* in dairy cattle from Pedreiras Basin**. Advisor: Ana Lucia Abreu Silva. Co- advisor: Alcina Vieira de Carvalho Neta.

This work aims to achieve the seroepidemiologic study of bovine babesiosis and anaplasmosis and diagnose the *Trypanosoma vivax* through parasitological and molecular examination in dairy cattle of Pedreiras basin. The detection of antibodies against *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* was conducted by the method of indirect ELISA. A total of 158 blood samples were collected, this number was determined by a mathematical model. Using molecular and parasitological examination, samples of 177 animals were obtained from twenty farms divided into four municipalities that make up the regional search for trypanosomiasis. The results show that the seroprevalence of babesiosis and anaplasmosis is high in Pedreiras and whether it is an area of enzootic stability. Moreover, the trypanosomiasis showed low positivity in both the parasitological examination on the PCR. However, the technique of PCR was more sensitive than the parasitological examination. We conclude that in the study area, the hemoparasitoses directly or indirectly cause economic losses.

Key-words: babesiosis, anaplasmosis, tripanossomíase, PCR, ELISA and Maranhão

## 1.1 Capítulo 1: Introdução

O Brasil é um país com grande vocação para pecuária, tendo atualmente no setor produtivo animal, potencial imensurável e de grande importância econômico-social. Para tornar mais racional o aproveitamento econômico da cadeia produtiva animal e maximizar o desenvolvimento da pecuária de modo sustentável, faz-se necessário utilizar as novas tecnologias, especialmente nas áreas de sanidade animal, epidemiologia e controle das enfermidades infecciosas e parasitárias que acometem os animais de produção (CAVALCANTE, 2007).

As doenças parasitárias tem causado danos ao homem e aos animais domésticos desde os tempos mais remotos. Atualmente as nações mais desenvolvidas têm controlado essas doenças dentro de suas fronteiras, porém os mesmos parasitos continuam causando mortes entre os países menos desenvolvidos. Frequentemente um ciclo vicioso é estabelecido: uma economia deficiente impede que se produza educação e medidas sanitárias eficientes e isto torna um povo continuamente suscetível a infecções parasitárias. A morbidade e a mortalidade resultante das doenças causadas por protozoários representam ainda hoje um formidável desafio à pesquisa científica e aos programas de saúde pública e animal (SILVA et al., 2002).

Segundo Perry et al (2002), as doenças de animais continuam afetando a produção pecuária, desenvolvimento agropecuário, o bem estar humano e a luta contra a pobreza de diferentes maneiras em muitas regiões dos países em desenvolvimento. Algumas dessas doenças afetam as regiões mais pobres, afetando a população humana, ocasionando mortes e inclusive incapacidade e sofrimento, criando assim uma barreira para o escape da pobreza. Segundo os mesmos autores, as tripanossomíases e as babesioses encontram-se localizadas na lista das 20 doenças mais importantes de acordo com seu impacto na pobreza.

Clinicamente essas enfermidades caracterizam-se por uma síndrome hemolítica e febril, cuja gravidade está diretamente relacionada à reação do

hospedeiro frente à infecção (McCOSKER, 1981). Com isso, são responsáveis por perdas econômicas consideráveis decorrentes do menor ganho ou perda de peso dos animais parasitados, decréscimo da produção de leite, infertilidade ou subfertilidade dos touros, abortamentos, mortalidade, gastos com medicamentos e serviço médico veterinário, além do estado crônico portador, que interfere no desenvolvimento normal dos animais (CAVALCANTE, 2007).

## **Revisão de Literatura**

### ***Babesia* spp.**

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

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

Cinco anos mais tarde, dois pesquisadores americanos, Smith e Kilborne, associaram a ocorrência de uma enfermidade que se caracterizava por apresentar alta taxa de mortalidade e sintomas muitos semelhantes à hemoglobinúria enzoótica bovina, à presença de microorganismos intraeritrócitários. Além de conseguirem caracterizar o microorganismo como sendo um protozoário, *Pyrosoma bigeminum*, comprovaram que este agente era

transmitido por um artrópode, o carrapato bovino da América do Norte, *Boophilus annulatus*. A publicação desses resultados constitui um marco histórico por ser o primeiro relato da transmissão de um protozoário por um artrópode (BOCK et al., 2004).

Ainda no ano de 1893, Starcovici verificou a similaridade entre os organismos descritos por Babés, na Romênia, e Smith e Kilborne nos Estados Unidos, e propôs a inclusão de ambos em um novo gênero chamado *Babesia*, em homenagem ao pesquisador romeno (UILENBERG, 2006).

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

*Babesia bovis* e *Babesia bigemina* são protozoários hemoparasitos, da ordem Piroplasmorida, família Babesiidae (LEVINE, 1988), agentes de importante enfermidade em bovinos, conhecida como babesiose. Na América do Sul a babesiose é transmitida exclusivamente pelo carrapato *Boophilus microplus*, 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). Além da importância destacada na pecuária, essas enfermidades constituem-se também em zoonoses (SUAREZ et al., 1997, KURT & GIRGINKARDESLER, 2001).

A babesiose ocorre freqüentemente devido às práticas de manejos instituídas no sistema de criação, como o uso de instalações “free stall” determinados tipos de bezerreiros e principalmente em importações de animais de áreas livres de hemoparasitos, para melhoramento genético bovino (LIMA, 1991). Essa realidade faz com que quase todas as regiões do país tenham sérios

problemas relacionados com a instabilidade enzoótica e preocupem-se em estabelecer programas sanitários visando à racionalização do controle do carrapato, integrando-o ao controle das doenças que transmite (ARTECHE, 1992).

*Babesia* é um parasito heteroxeno, ou seja, necessita de dois hospedeiros para completar o ciclo biológico, o bovino e o carrapato. No bovino, hospedeiro vertebrado, ocorre somente reprodução assexuada dos protozoários e no carrapato, hospedeiro invertebrado, ocorre tanto reprodução assexuada como sexuada (FRIEDHOFF, 1988).

A fêmea do carrapato se infecta com *B. bigemina* no final da fase parasitária no bovino. No intestino do carrapato inicia-se a reprodução sexuada dando origem aos oocinetos que invadem todos os órgãos do carrapato, inclusive ovários, num processo contínuo de divisão assexuada. Através da infecção dos ovários, os oocinetos passam aos ovos e larvas, configurando a transmissão transovariana, de geração a geração. O processo de esporogonia continua nas larvas, invadindo também todos os órgãos, inclusive as células da glândula salivar, onde são produzidos os esporozoítos que serão transmitidos aos bovinos por ocasião do parasitismo do carrapato. Nos bovinos, os esporozoítos vão diretamente parasitar os eritrócitos, se transformando em merozoítos que por reprodução assexuada formam novos parasitos que invadem novas células e assim sucessivamente (FRIEDHOFF, 1988).

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

Os sintomas clínicos e o curso da infecção dependem também da espécie do protozoário envolvido; no entanto, infecções por *B. bigemina* ou *B. bovis* determinam febre, anemia, hemoglobinemia, hemoglobinúria e fraqueza, podendo evoluir para a morte do animal (RADOSTITS et al., 2000). Segundo Mahoney & Mirre (1977) e Pandey & Mishra (1978), mostraram que existe uma

correlação direta entre a elevação da temperatura corpórea e o aumento da parasitemia.

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

O processo patológico em babesiose está relacionado ao crescimento e multiplicação de *Babesia* dentro dos eritrócitos (MAHONEY et al., 1973). Segundo Mahoney & Mirre (1977), dois eventos ocorrem no hospedeiro parecendo ter um papel central na patogenia da babesiose: a destruição dos eritrócitos e o aumento de substâncias farmacologicamente ativas. A anemia ocorre pela destruição e/ou seqüestro dos eritrócitos pelo sistema fagocítico mononuclear devido a adesão do protozoário à superfície dos mesmos, o que passa a ser reconhecido pelo sistema imunológico como um corpo estranho. Segundo BROWN et al. (2006a) as hemácias parasitadas expõem na superfície de sua membrana antígenos que auxiliam a fagocitose e ativação do sistema imunológico.

Soares et al. (2000) descrevem que as babesias desencadeiam anemia, principalmente, pela destruição eritrocítica decorrente dos aspectos biológicos dos agentes em realizarem parte de seu ciclo no interior destas células. A destruição de eritrócitos geralmente é maior do que atribuído à saída dos parasitos destas células, sendo que *B. bigemina* aumenta a fragilidade osmótica dos eritrócitos em geral e *B. bovis* aumenta a fragilidade dos eritrócitos não parasitados, provocando hemólise. Também ocorre um aumento indiscriminado de fagocitose (MAHONEY et al., 1973).

Dentre as principais alterações hematológicas, a anemia, que no início é normocítica normocrômica, torna-se macrocítica normocrômica pela presença de reticulócitos. Tal patologia é resultado direto da hemólise intravascular que é conseqüência da reprodução e evasão dos merozoítas, causando o rompimento dos eritrócitos parasitados. Ao mesmo tempo, ocorre a deposição de metabólitos do parasito sobre a membrana celular de vários eritrócitos, fazendo com o que

eritrócitos normais que apresentam complexos estranhos em sua superfície, sejam fagocitados (MURASE et al., 1996; FIGHERA, 2001). Segundo Aragon (1976), a anemia é diretamente proporcional à parasitemia, com o agravamento da doença, mesmo eritrócitos não parasitados passam a ter maior fragilidade osmótica (WRIGHT, 1981).

Nas babesioses, a fase aguda da enfermidade é caracterizada não só pelos sinais de hemólise, mas também por uma parasitemia elevada (BÖSE et al., 1995), onde as manifestações clínicas começam quando o parasito se torna detectável no esfregaço sanguíneo (MAHONEY et al., 1973).

Segundo Gonçalves (2000), em áreas endêmicas, onde a população de vetor é alta e presente durante todo o ano, a maioria dos animais jovens é infectada, o que induz a uma resistência natural. Além disso, a incidência sazonal de *Babesia* spp na hemolinfa de carrapatos pode interferir na taxa de inoculação do parasito. Em áreas onde a ocorrência do *B. microplus* infectado com *Babesia* spp é permanente, há um equilíbrio entre o bovino e o parasito, criando uma situação de estabilidade. Nessas áreas, não são esperados surtos da doença e nem de mortalidade em animais adultos, pois eles já são portadores.

Benavides e Sacco (2007) citam que as características genéticas também provocam variações nos sinais clínicos, onde dentro de um grupo homogêneo de animais desafiados com *B. bovis* constatou-se três diferentes fenótipos: animais suscetíveis, intermediários e resistentes. As respostas individuais irão ocasionar maior ou menor intensidade aos sinais clínicos característicos da doença.

As raças bovinas se comportam de modo diverso frente às infestações por carrapatos: enquanto raças européias são mais sensíveis, as raças zebuínas apresentam uma resistência de caráter genético, muito maior (GOMES, 1998; JONSSON et al., 2000). Essa característica é transmitida de geração para geração, guardando uma proporção em relação ao grau de sangue resultante do cruzamento; assim, animais da primeira geração (F1) resultante do cruzamento de

taurinos com zebuínos são ainda bastante suscetíveis ao carrapato e às doenças por ele transmitidas (SARTOR et al., 1992; BOCK et al., 1999).

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

Ao que tudo indica, outros fatores além dos anticorpos colostrais estariam envolvidos na resistência relacionada à idade, visto que a resistência de animais jovens excede o período de proteção dos anticorpos colostrais (BROWN et al., 2006a). Além disso, bezerros nascidos em regiões livres de *Babesia* spp. também apresentam certo grau de resistência às infecções experimentais (GOFF et al., 1982).

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 imunológico 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 imunológica adaptativa mediada por linfócitos T e B (BOCK et al., 2004). Desta forma a imunidade inata é essencial para ativação da resposta imunológica 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<sup>+</sup> através do 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 imunológica adquirida, (BROWN e PALMER, 1999; MACHADO et al., 2004). Goff et al. (2002) relataram que o IFN- $\gamma$  secretado por macrófagos ativados frente a merozoítos de *babesia*, representa um papel chave na resposta imunológica 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) (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 (GOFF et al., 2002). Terneiros resistem à infecção por *B. bovis* por expressar precocemente níveis mais altos de IL-12, IFN- $\gamma$  e óxido nítrico (ESTES e BROWN, 2002; BROWN, 2006a).

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, a cinética da produção de anticorpos contra *B. bigemina* 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). A fase aguda da enfermidade é caracterizada não só pelos sinais de hemólise, mas também por uma parasitemia elevada (BOSE et al., 1995).

### ***Anaplasma marginale***

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

Em 1910, Theiler, na África do Sul, identificou *Anaplasma marginale* como sendo o agente etiológico de uma enfermidade muito similar à febre do Texas, que era conhecida como febre biliar bovina. Antes disso, Smith & Kilborne (1893) consideraram que as “granulações endoglobulares” ou “peripheral coccuslike” seriam produtos da multiplicação de piroplasmas causadores da Febre do Texas. Ao descrever a “Tristeza” na República Argentina, Lignieres (1900) também mencionou a presença dessas granulações, sem, contudo, classificá-las

como anaplasmas. Ainda na região da Plata, Knuth (1905) considerou que os anaplasmas eram parte do ciclo biológico de "*piroplasma bigeminum*" (FONSECA & BRAGA, 1924). Por esse breve histórico é possível perceber que, a princípio, as similaridades entre as infecções causadas por *Babesia* spp. e *Anaplasma marginale*, associadas ao fato de suas distribuições serem coincidentes, representaram uma complicação na caracterização individual desses hemoparasitos e explicam o seu agrupamento em uma única síndrome denominada popularmente de "Tristeza Parasitária dos Bovinos" (CAVALCANTE, 2007).

O *A. marginale* é classificado como um organismo pertencente à Ordem Rickettsiales que inclui duas famílias: Anaplasmataceae e Rickettsiaceae. Os membros da família Anaplasmataceae são parasitos intracelulares obrigatórios, encontrados exclusivamente no interior de vacúolos no citoplasma da célula hospedeira (KOCAN et al., 2002).

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

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

A transmissão biológica de *A. marginale* já foi demonstrada experimentalmente em mais de 20 espécies de carrapatos ixodídeos (KOCAN et al., 1992; STILLER & COAN, 1995; KOCAN et al., 2004), mas a relevância de cada uma dessas espécies na transmissão, sob condições naturais, ainda não está bem definida (GONÇALVES-RUIZ et al., 2002). No Brasil, onde o carrapato

*B. microplus* ocorre de forma endêmica as evidências epidemiológicas sugerem ser ele o principal vetor de *A. marginale* (GUGLIELMONE, 1995, KESSLER, 2001).

Os carrapatos podem transmitir agentes patogênicos pelas vias transestadial ou intra-estadial (GONÇALVES-RUIZ et al., 2002).

Apesar de o carrapato *B. microplus* ser um parasito monoxeno e realizar as ecdises sobre o hospedeiro, admite-se que a transmissão transestadial (de larvas para ninfas e de ninfas para adultos) possa ocorrer, pois os carrapatos mudam frequentemente de hospedeiro ao se deslocarem do local de fixação do instar anterior para fixar-se e reiniciar a alimentação do novo instar (KESSLER, 2001). Destaca-se nesse sentido a possibilidade de bezerros lactentes se infectarem com carrapatos provenientes de suas mães (MELO et al., 2001).

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

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

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

Os dados experimentais sobre a eficiência e o impacto da transmissão mediada por insetos hematófagos são escassos. De acordo com Scoles et al.

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

A via transplacentária é outra forma referida de transmissão de *A. marginale* cuja importância epidemiológica necessita de melhor definição. A maioria dos relatos de transmissão congênita refere-se a casos em que bezerros recém nascidos desenvolveram doença hemolítica grave (PAINE & MILLER, 1977, NORTON et al., 1983; PASSOS & LIMA, 1984). No entanto, RIBEIRO et al. (1995), utilizando métodos sorológicos de diagnóstico, detectaram a transmissão congênita de *A. marginale* em 4 de 11 bezerros nascidos de vacas inoculadas e em 2 de 97 fetos examinados em abatedouro, demonstrando que na fase aguda da infecção a transmissão congênita seria mais frequente.

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

Nos bovinos, *A. marginale* é encontrada exclusivamente no interior dos eritrócitos onde, ao se multiplicar por fissão binária, produz rickettsias persistentes que são detectáveis, microscopicamente, quando o número de eritrócitos parasitados excede a  $10^7$  células (CAVALCANTE, 2007). Estudos de microscopia eletrônica revelaram que *A. marginale* penetra nos eritrócitos sob a forma de corpúsculo inicial, graças a uma invaginação da membrana do eritrócito (RISTIC & CARSON, 1977) que dá origem a um vacúolo. Logo após a invasão, tem início a multiplicação por fissão binária e a formação de um corpúsculo de inclusão contendo de quatro a oito corpúsculos iniciais. Os corpúsculos formados deixam o eritrócito sem rompê-lo e invadem outras células vermelhas, dando continuidade ao ciclo (KOCAN et al., 2003).

Inicialmente, o número de eritrócitos parasitados aumenta exponencialmente, quando então são fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), resultando em anemia e icterícia, sem que ocorra hemoglobinemia e hemoglobinúria (De la FUENTE et al., 2001). Além da alteração eritrocitária, Alfonso et al. (1996) demonstraram que após o segundo dia da infecção experimental por *A. marginale* se instala um quadro de leucocitose que desaparece após cerca de 30-35 dias a infecção. O quadro clínico ainda é caracterizado por febre e perda de peso, podendo levar os animais a óbito.

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

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

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

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

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

Se por um lado a resistência etária nas infecções por *A. marginale* seja reconhecida consensualmente à semelhança do que se observa nas babesioses bovinas, a suscetibilidade relacionada à raça é contestável. Em diversos estudos realizados sob condições naturais ou experimentais (OTIM et al., 1980; BOCK et al., 1997; BOCK et al., 1999) verifica-se que quando se detecta alguma diferença em favor dos zebuínos, ela é muito discreta. Parker et al. (1985) relataram que as manifestações da infecção por *A. marginale* foram apenas ligeiramente mais brandas em novilhas zebuínas puras do que em novilhas taurinas. Bock et al. (1997) avaliaram as consequências da infecção em novilhos taurinos, zebuínos e cruzados meio-sangue e  $\frac{1}{4}$  zebu e concluíram que independentemente da raça e

do grau de sangue há risco de desenvolvimento de doença grave, quando os animais são expostos a isolados virulentos de *A. marginale*.

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

O *A. marginale* determina as formas clínicas aguda, superaguda, leve e/ou crônica, (RISTIC, 1981; MARTINS & CORRÊA, 1995), com um período pré patente de 20 a 40 dias seguido por parasitemia. No pico da enfermidade, a queda do hematócrito é acentuada e mais de 75% dos eritrócitos podem estar infectados, com o quadro podendo persistir por uma a duas semanas (NASCIMENTO et al., 1981; KREIER et al., 1991). Os sinais observados consistem de anemia hemolítica, icterícia, dispnéia, taquicardia, febre, fadiga, lacrimejamento, sialorréia, diarreia, micção frequente, anorexia, perda de peso, aborto, às vezes agressividade (RISTIC, 1981; ALDERINK & DIETRICH, 1983; BARBET, 1995), podendo levar o animal à morte em menos de 24 horas (FARIAS, 1995).

### ***Trypanosoma vivax***

As tripanossomíases são causadas por espécies do gênero *Trypanosoma* que pertencem ao filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida. Os tripanosomas estão entre os mais primitivos dos eucariótos e, devido a sua linhagem ancestral não é surpreendente que apresentem propriedades biológicas não usuais. Eles estão entre os primeiros eucariontes por terem mitocôndria e uma de suas mais marcáveis características é seu DNA mitocôndrial, conhecido como DNA cinetoplástico (kDNA), localizada na base do flagelo. Contrário a qualquer outro DNA na natureza, o kDNA está organizado dentro de uma rede contendo vários milhares de círculos de DNA interligados topologicamente. Os círculos são de dois tipos. Há vários milhares de pequenos minicírculos e de uma

a poucas dúzias de maxicírculos. Cada célula contém uma única rede dentro da matriz de sua única mitocôndria (ENGLUND et al., 1996).

Enquanto a taxonomia destes protozoários flagelados tem sido cada vez mais acurada nos últimos tempos, a origem e evolução dos mesmos são ainda pouco conhecidas. Na falta de registros fósseis, a evolução dos Kinetoplastida tem sido bastante especulativa. Entretanto, com o uso das ferramentas modernas e informações genéticas, atualmente está se começando a inferir quais poderiam ter sido seus ancestrais (SILVA et al., 2002).

Um dos primeiros a especular sobre as relações filogenéticas dos tripanosomas foi Leger (1904), sugerindo que seus ancestrais teriam sido parasitos monogenéticos de insetos não hematófagos. Quase sessenta anos mais tarde, Baker (1963) sugeriu uma filogenia na qual um tripanosomatídeo ancestral deu origem a dois grupos: o primeiro contendo linhagens transmitidas por insetos (triplanosomas de crocodilos, aves e mamíferos, excluindo o grupo dos “Salivaria”), e o segundo contendo espécies transmitidas por sanguessugas (triplanosomas de peixes, anfíbios e répteis aquáticos). Os tripanosomas africanos teriam então divergido da linhagem dos vertebrados aquáticos transmitidos pela sanguessuga. Esta hipótese foi compartilhada por Woo (1970). Adicionalmente, Hoare (1972) propôs que a seção Salivaria teria originado recentemente a partir dos tripanosomas Stercoraria.

Uma segunda hipótese para a origem dos Kinetoplastida foi proposta originalmente por Minchin (1908), que sugeriu que os ancestrais dos tripanosomatídeos teriam parasitado inicialmente o intestino de antigos vertebrados aquáticos. O sangue teria sido invadido logo após e subsequentemente, estes tripanosomatídeos teriam passado para as sanguessugas e insetos hematófagos. Estes, por sua vez, teriam espalhado os parasitos nos diferentes grupos de vertebrados, terrestres e aquáticos. Esta hipótese recebeu mais tarde apoio de diferentes grupos (LAVIER, 1943; WALLACE, 1966; LAINSON e SHAW, 1987).

Análises preliminares da filogenia molecular dos Kinetoplastida, usando genes ribossomais (rDNA) sugeriram que a origem dos tripanosomas era parafilética (MARCHE et al., 1995; BERCHTHOLD et al., 1994). Por outro lado, as comparações dos aminoácidos dos genes de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (WIEMER et al., 1995) ou sequências que codificam para outras proteínas (HASHIMOTO et al., 1995; ALVAREZ et al., 1996; HAAG et al., 1998) sugeriram monofilia das seções Salivaria e Stercoraria. Um estudo completo envolvendo um maior número de gêneros dos Kinetoplastida concordou com a monofilia dos tripanosomas (STEVENS & GIBSON 1999). As estimativas da divergência dos Salivaria são de 335 (HAAG et al. 1998) e 100 milhões de anos (STEVENS e GIBSON, 1999), o que colocaria a origem destes tripanosomas na época em que os continentes estavam juntos (Pangea) ou na época em que a África se separou dos outros continentes, respectivamente. Finalmente, Overath et al. (2001) sugeriram que os Salivaria apareceram originalmente em répteis, os vertebrados dominantes na época em que estes tripanosomas divergiram. A transferência de répteis para mamíferos teria acontecido quando as moscas tsé-tsé ou seus ancestrais surgiram.

Todos os hemoflagelados pertencem à família *Trypanosomatidae*. Baseado no modo de transmissão, Hoare (1972) e Losos (1986) concordaram na divisão do gênero *Trypanosoma* em duas seções: “*Salivaria*” e “*Stercoraria*”. Os tripanosomas da seção *Salivaria* são aqueles transmitidos através das glândulas salivares (inoculativa), e os *Stercoraria* aqueles que são transmitidos por meio das fezes dos insetos vetores (contaminativa). Nessas revisões, esses autores concordaram também na divisão da seção Salivaria em quatro subgêneros (*Dutonella*, *Pycnomonas*, *Nannomonas* e *Trypanozoon*) e a seção Stercoraria em três subgêneros (*Herpetosoma*, *Megatrypanum* e *Schizotrypanum*). Losos (1986) sugere uma classificação prática dos tripanosomas de importância médica e veterinária, como se segue:

### **Salivaria**

Subgênero *Duttonella*

Espécie: *Trypanosoma vivax*

Subgênero *Nannomonas*

Espécies: *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma simiae*

Subgênero *Trypanozoon*

Espécies: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma. equiperdum*

Subgênero: *Pycnomonas*

Espécie: *Trypanosoma suis*

### **Stercoraria**

Subgênero *Schizotrypanum*

Espécie: *Trypanosoma cruzi*

Os tripanosomas patogênicos de importância pecuária se encontram todos localizados na seção Salivaria, dos quais apenas *T. vivax*, *T. equiperdum* e *T. evansi* podem ser encontrados na América do Sul (SILVA et al., 2002).

O *T. vivax* e o *T. evansi* são um risco potencial para mais de 500 milhões de bovinos e 100 milhões de búfalos (PEREGRINE, 1994). O *T. vivax* infecta um grande número de espécies de ungulados selvagens e domésticos. Na África é o responsável pela tripanossomíase em equinos, bovinos e outros ruminantes. Os camelos são também suscetíveis ao *T. vivax*, cães e suínos são refratários ao mesmo (SILVA et al., 2002).

Como resultado da sua co-evolução, tripanosomas são muitas vezes não patogênicos em animais selvagens (MULLA & RICKMAN, 1988). Do mesmo modo, algumas raças de bovinos permanecem relativamente saudáveis e produtivas em áreas onde ocorrem tripanossomíases transmissíveis por mosca (MURRAY, et al. 1979). Embora estes animais tornam-se infectados, são mais resistentes à patogenicidade consequentes da infecção do que outras raças.

Naturalmente gado resistente à doença é conhecido como trypanotolerantes e inclui *Bos taurus* (OSÓRIO et al.; 2008). Em áreas onde existe um elevado risco de infecção, gado trypanotolerante continua a crescer e reproduzir, enquanto gado zebu (*Bos indicus*) torna-se caquético, fraco, propenso ao aborto, e frequentemente vem a óbito (MURRAY et al. 1982). No entanto, ambas as raças de bovinos são altamente suscetíveis à infecção por cepas de *T. vivax* hemorrágico (WILLIAMS et al. 1992).

Esse tripanosoma é transmitido ciclicamente pelas moscas tsé-tsé e mecanicamente por outras moscas hematófagas. As moscas dos estábulos e outros tabanídeos (“mutucas”) podem ser vetores somente na Américas e nas áreas da África onde não ocorre a mosca tsé-tsé (LEVINE, 1973). Os bezerros são mais resistentes que os bovinos adultos e podem se infectar, sobreviver e tornar-se portadores. Os transmissores são os tabanídeos, *Stomoxys calcitrans* e talvez outros insetos hematófagos. O *T. vivax* é encontrado em toda a área ocupada pela mosca tsé-tsé na África. No Oeste da África o *T. vivax* é considerado o mais patogênico e importante tripanosoma que afeta os bovinos. Ele, contudo, tem se expandido para outras áreas da África e América Central, América do Sul e Caribe (SILVA et al., 2002).

A primeira ocorrência do *T. vivax* nas Américas foi observada na Guiana Francesa em 1919 e mais tarde em outros países da América do Sul, Central, e algumas ilhas do Caribe (SILVA et al., 2002).

No Brasil, a ocorrência do *T. vivax* foi mencionada pela primeira vez por Boulhosa (1946) em bovinos da zona bragantina no Estado do Pará. Posteriormente, Shaw e Lainson (1972) descreveram o parasito em um búfalo (*Bubalus bubalis*) nas proximidades da cidade de Belém, Pará. Outros relatos sobre *T. vivax* foram feitos também por Serra-Freire (1981), em ovinos e bovinos, no Oiapoque, Amapá; em búfalos no Amapá, por Serra-Freire (1983). Na região Centro-Oeste, foram feitos relatos do parasito em bovinos no Pantanal de Poconé no estado do Mato Grosso (SILVA et al. 1995, 1996) e no Pantanal do Mato Grosso do Sul no município de Miranda (PAIVA et al., 1997). No Maranhão existe

apenas um registro em Itapecuru Mirim, município próximo à capital do estado (GUERRA et al., 2008).

Fora das áreas de ocorrência da mosca tsé-tsé, como na América do Sul, o parasitismo é realizado por outras moscas hematófagas quando a transmissão é monocíclica. Assim, os parasitos são transmitidos mecanicamente por hospedeiros vertebrados, sem crescimento ou multiplicação nos insetos (HOARE, 1972; MOLYNEUX & ASHFORD 1983; GARDINER, 1989). Nestes casos, a mosca alimenta-se de mais de um animal antes da repleção e permanece infectada por apenas um curto espaço de tempo. No entanto, a transmissão mecânica de *T. vivax* por outras moscas hematófagas, exceto a tsé-tsé, permitiu ao parasito estabelecer-se na América do Sul e Ilhas Maurícias. Na América do Sul, *T. vivax* foi disseminado pelas “mutucas” (*Tabanidae*) (HOARE, 1972) e moscas dos estábulos (*Stomoxys* spp.) (LEVINE, 1973). Transmissão mecânica entre vacas foi experimentalmente demonstrada para tabanídeos *Cryptotylus unicolor* (FERENC et al. 1988 *apud* DWINGER & HALL 2000), e *Tabanus importunus* (RAYMOND, 1990) na Guiana Francesa, e para *Tabanus nebulosus* na Colômbia (OTTE & ABUABARA, 1991). Embora tenha sido proposto que o parasito pode ser transmitido ciclicamente na América do Sul por um vetor desconhecido diferente da *Glossina* (WELLS, 1972), nenhuma prova está disponível para apoiar esta hipótese. Transmissão mecânica de isolados Africanos de *T. vivax* foi recentemente demonstrada em condições experimentais com tabanídeos (DESQUESNES & DIA 2003, 2004). Estes dados sugerem que, na África, transmissão mecânica e cíclica co-existem no campo. No entanto, apenas transmissão mecânica pode explicar a presença permanente de *T. vivax* fora da área da tsé-tsé. Alguns autores também mencionaram mosquitos como potenciais vetores de *T. vivax* na Venezuela e em Cuba (RUIZ-MARTINEZ, 1971; CORDOVES et al., 1982). Experimentalmente, *T. vivax* também pode ser transmitida por transfusão de sangue infectado (VAN DEN BOSSCHE et al., 2000).

Para a transmissão mecânica ser alcançada, uma série de condições deve ser cumprida simultaneamente (alta parasitemia em transportadoras, a abundância dos vetores, a disponibilidade de receptores), e, conseqüentemente, a sua probabilidade é relativamente baixa. Isso explica por que a transmissão não é observada todos os anos. No entanto, quando estas condições forem preenchidas, a incidência de infecções transmitidas mecanicamente é muito elevada (> 70% por mês) e desencadeia surtos (OSÓRIO, 2008).

O grau de parasitemia nos mamíferos hospedeiros afeta a taxa de transmissão mecânica de *T. vivax* (ROBERTS et al., 1989). Uma ligação direta entre o nível de parasitemia e o sucesso da transmissão pode ainda ser estabelecida (DESQUESNES et al., 2005). Outro fator associado a esta taxa é a presença de tabanídeos, que tem grandes populações em áreas pantanosas. Otte et al. (1994) encontraram uma significativa relação temporal entre a atividade alimentar de tabanídeos e a incidência de *T. vivax*, fornecendo evidências para o papel desempenhado por estes insetos em infecção por *T. vivax*.

Na América Latina, transmissão transplacentária de *T. vivax* e a manifestação peri-natal da tripanossomíase parecem ser de relevância epidemiológica. Índícios reunidos por Betancourt (1978, *apud* DWINGER & HALL, 2000) da Venezuela, foram mais tarde confirmados em condições experimentais, no mesmo país (MELÉNDEZ et al., 1993), bem como durante os focos de infecção no Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil (BARBOSA Jr et al., comunicação pessoal). Na África, em contraste, a transmissão transplacentária é incomum (OGWU & NURU, 1981) e, portanto de baixa relevância na epidemiologia da doença (DWINGER & HALL, 2000).

Em áreas onde transmissão de *T. vivax* é estritamente mecânica, tais como na América Latina, a tripanossomíase bovina ocorre na forma de surtos epizooticos periódicos múltiplos. As situações epidemiológicas são instáveis uma que a transmissão mecânica é imprevisível. Após uma “onda epizootica”, as infecções são gradualmente eliminadas pela auto-cura e tratamento (inicialmente, tratamentos contra a tripanossomíase, no caso de um surto epizootico e, mais

tarde, possivelmente contra babesiose). Durante este período, o que poderia ser referido como o “período inter-epizoótico”, concomitante imunidade torna-se estabelecida e mantém parasitemia muito baixa. É muito difícil detectar parasitos no sangue dos animais (prevalência parasitológica é nula), mas a presença do parasito na população é, no entanto confirmado pela prevalência não insignificante de anticorpos ao longo de vários anos. Depois de vários anos, a maioria da população torna-se suscetível (soroprevalência abaixo para 20%-30%), e quando outras circunstâncias (imunossupressão sazonal que leva à alta parasitemias em um número de proliferação de transportadoras e vetor) outro “surto epizoótico” é desencadeado. Este fenômeno, que pode referir-se como “uma gangorra epidemiológica” é típico de transmissão mecânica de tripanossomíase bovina e tem sido observada em diversos países da América do Sul (Guiana Francesa, Colômbia e Venezuela) (DESQUESNES, 1997). Os tripanossomos que são responsáveis pelos focos epizoóticos já estão presentes nos rebanhos e quando os animais passam por estresse, tais como seca e hiper abundância de insetos hematófagos ou há movimentação dos rebanhos a doença se manifesta clinicamente. É por isso que a doença ocorre frequentemente sob a forma de focos múltiplos (concomitante ressurgem sob o efeito do clima, ou a disseminação da doença por um lote de animais transportadores que são vendidos individualmente aos diferentes agricultores). Esta alternância entre fases “epizoóticas clínica” e “inter-epizoóticas subclínica” é caracterizada por longos períodos de silêncio durante o qual o parasito não é visível seguido de muito difundida explosões clínicas (DESQUESNES, 2004).

Certos isolados africanos de *T. vivax* podem causar doença aguda acompanhada de síndrome hemorrágica (MWONGELA et al. 1981, ROEDER et al. 1984). Características típicas destas infecções incluem alta, persistente parasitemia, febre, anemia muito acentuada, e hemorragia visceral generalizada e nas mucosas, especialmente no trato gastrointestinal. No campo, a doença afetando bovinos adultos pode ser grave o suficiente para levar à morte ou aborto, mesmo antes do diagnóstico ser atingido e tratamento poder ser iniciado

(MWONGELA et al. 1981). No entanto, essa característica nunca foi descrita na América Latina (DESQUESNES, 2004).

Na América do Sul, a doença causada por *T. vivax* em bovinos adultos é acompanhada por febre, parasitemia, anemia, letargia, perda da função física, diminuição da produção de leite, aborto e morte (LOSOS & IKEDE, 1972). Lacrimejamento, edema subcutâneo da cabeça, epistaxe e diarreia foram relatadas em bovinos que morreram após infecção experimental (VOHRADSKY, 1971). Estudos experimentais têm sido realizados em bovinos, ovinos, caprinos, suínos e equinos utilizando *T. vivax* isolado de um búfalo do Norte brasileiro estado do Amapá. O quadro clínico mais frequente incluiu febre intermitente, lacrimejamento, descarga nasal, anemia, edema e progressiva perda de peso (SOUZA, 1980). A anemia é o principal sinal de tripanossomíase bovina, bem como a sua persistência é responsável por insuficiência cardíaca congestiva (SANNUSI, 1979 apud GARDINER, 1989). Estas são as principais causas de morte no campo (MURRAY et al. 1979).

O período pré patente de infecção por *T. vivax* é variável, dependendo do hospedeiro e do parasito isolado. Em ovinos e caprinos, o período de incubação dura entre quatro a 12 dias (HOOF et al. 1948). Em bovinos, que varia de nove a 14 dias para os isolados virulentos, e de nove a 59 dias em infecções com menos isolados patogênicos (HOARE, 1972). As parasitemias de *T. vivax* exibem flutuações irregulares, como alguns casos, ocorrem em níveis elevados no período da manhã e em níveis mais baixos na parte da tarde do mesmo dia. Como regra, porém, um período inicial de parasitemia durará vários meses antes da tripanossomíase tornar-se indetectável no sangue. Após essa fase, ocorrem períodos de recorrência (HOOF et al. 1948). Doenças intercorrentes também são conhecidas como fatores predisponentes para a infecção por *T. vivax* em bovinos (DESQUESNES & GARDINER, 1993).

Otte et al. (1994) mostraram que a doença pode tornar-se subclínica em definições endêmica, embora ainda cause importantes perdas na produção. Animais recuperados da doença podem tornar-se reservatórios, com baixa ou

mesmo indetectáveis níveis do parasito no sangue (PLATA, 1931). Na fase sem parasitemia, tripanosomas podem ser encontrados nos linfonodos, olhos, e no líquido cefalorraquidiano (HOARE, 1972, WHITELAW, et al. 1988, TUNTASUVAN, et al. 1997). A doença inaparente podem ser reativadas por estresse. Como consequência, o agente infeccioso pode propagar-se rapidamente quando o movimento de bovinos ao longo de rotas comerciais é combinado com a disponibilidade de potenciais vetores (DWINGER & HALL, 2000). Dada à possibilidade de localização extravascular, *T. vivax* pode danificar diretamente os tecidos, como quando os tecidos oculares estão envolvidos, com a consequente ceratite (HOARE, 1972), ou quando o músculo cardíaco apresenta lesões caracterizadas por hemorragia e infiltrado mononuclear (VAN DEN INGH & NEIJS-BAKER, 1979, VALLI & FORSBERG, 1979, KIMETO et al. 1990).

Nas várias fases, tripanosomíase devido ao *T. vivax* assemelha-se a uma série de outras doenças, e isso ocorre com frequência, ao mesmo tempo em que outras infecções. Na fase aguda febril, tripanosomíase deve ser diferenciada da babesiose, anaplasiose, e até mesmo febre da Costa Leste na África. Tripanosomíase aguda raramente produz icterícia e não é acompanhado por hemoglobinúria. Estas características e achados parasitológicos diferenciam tripanosomíase da babesiose. A forma crônica é uma doença afebril da qual anemia, emagrecimento, e linfadenomegalia são sintomas comuns. É importante diferenciar essa doença de desnutrição e helmintoses. Em nenhuma destas condições linfadenomegalia é encontrado. A detecção dos ovos de helmintos nas fezes é um complemento útil para o diagnóstico de helmintoses, mas a ausência de ovos nas amostras fecais colhidas de bovinos com fasciolose crônica, bem como a ocorrência de anemia e edema subcutâneo, pode tornar o diagnóstico diferencial difícil. Nos casos de desnutrição, o grau de anemia é raramente severo na escala do rebanho, como é na tripanosomíase, embora marcadas variações individuais ocorram (OSÓRIO et al.; 2008).

O controle da doença deve combinar circulação restrita de animais doentes, o tratamento dos animais infectados com *T. vivax*, distribuição da

vigilância epidemiológica e gravidade da doença, e eliminação ou controle do vetor (DWINGER & HALL, 2000). O tratamento satisfatório da tripanossomíase requer mais do que uma correta administração da droga tripanossomicida, e a velocidade de recuperação é em grande parte determinada pelo plano de nutrição, a quantidade de exercício durante a convalescência, bem como a duração da doença. Bem descansado e bem alimentado animais recuperam mais rapidamente após terapia tripanomicida do que animais desnutridos que têm de caminhar longas distâncias para chegar às pastagens e água. (KINABO, 1993; VAN DEN BOSSCHE, et al. 2000).

Considerando-se o histórico da expansão da tripanossomíase por *T. vivax*, a economia em processo de globalização, com conseqüente comercialização de animais entre os países sul-americanos, faz-se necessário um maior e melhor conhecimento desta doença nos animais de produção. Partindo do princípio de que o diagnóstico das infecções por *T. vivax* é um desafio em função da baixa parasitemia observada na maioria das infecções, reforça-se a importância da necessidade do conhecimento da soropidemiologia desta enfermidade, aliado ao fato de não haver dados para o estado do Maranhão que nos permita avaliar o impacto desta parasitose.

## **Diagnóstico**

O exame direto de esfregaços sanguíneos colhidos de ponta de orelha é o principal método diagnóstico empregado, pois além da praticidade é o método que apresenta o mais baixo custo. Porém a baixa sensibilidade dessa técnica é um fator limitante para a aplicação em estudos epidemiológicos, em decorrência da incapacidade de se detectar animais cronicamente infectados convertidos ao estado de portador (BOSE et al., 1995; COSTA-JUNIOR et al., 2006).

Apesar de apresentarem elevadas sensibilidade e especificidade, uma das principais limitações dos métodos sorológicos é que eles apenas indicam a

exposição ao agente infeccioso, não informando sobre o curso da infecção (WAGNER et al., 1992).

O advento das técnicas moleculares de diagnóstico propiciou a conjugação de elevada sensibilidade e especificidade com a possibilidade de detecção do próprio parasito, e não de anticorpos. Essa característica é particularmente interessante, pois permite discriminar os animais infectados que apresentam baixa parasitemia daqueles que por haverem eliminado as infecções não são fonte de infecção para os carrapatos (CAVALCANTE, 2007).

Com os avanços da biologia molecular, as novas técnicas de diagnóstico oferecem algumas vantagens em relação aos testes sorológicos mais utilizados, pois são mais específicos, sensíveis e mais ágeis, permitindo que as medidas de controle sejam adotadas com maior segurança (GASSER, 1999).

Para o diagnóstico da infecção por *Babesia* spp. deve ser levado em conta dados epidemiológicos, sinais clínicos, exames laboratoriais e lesões observadas na necropsia. No caso de animais com sinais clínicos, surtos ou mortes, o mais importante é o diagnóstico clínico, imediato, através da avaliação dos sintomas como febre, anemia, icterícia, anorexia, hemoglobinúria e sintomas nervosos. O diagnóstico pelos sinais clínicos é relativamente simples, porém muitas vezes a doença se apresenta de forma super aguda, onde os sintomas nem sempre são identificados. Além disso, a avaliação dos sinais clínicos de forma isolada não permite um diagnóstico específico, já que os sintomas podem ser comuns a outras enfermidades (MADRUGA et al., 1986).

A infecção pode ser avaliada de forma indireta através da técnica de Imunofluorescência Indireta (GUGLIELMONE et al., 1991), de forma direta através da subinoculação em terneiros esplenectomizados (MAHONEY et al., 1973) e pela técnica de reação em cadeia da polimerase – PCR (FIGUEROA et al., 1992).

O diagnóstico epidemiológico é de grande valia para verificar a presença e intensidade do agente no meio ambiente, através da identificação de animais portadores sadios, permitindo a programação de medidas profiláticas adequadas (MAHONEY et al. 1973). A identificação dos animais cronicamente infectados, ou

seja, sem apresentar sintomatologia clínica, pode ser feita de maneira indireta ou direta.

O imunodiagnóstico através de testes sorológicos é capaz de verificar a presença e intensidade de anticorpos específicos no soro dos animais e serve indiretamente como indicador da presença do agente (MAHONEY, 1962). Segundo BÖSE et al. (1995), muitos testes têm sido desenvolvidos para a detecção de anticorpos para *Babesia* spp.; entretanto, três são rotineiramente mais utilizados: os testes de imunofluorescência indireta, ELISA e fixação de complemento .

Cada prova sorológica apresenta vantagens e desvantagens, conforme seu nível de sensibilidade, especificidade, simplicidade e custo (WEILAND & REITER, 1988). As técnicas sorológicas de rotina, particularmente, imunofluorescência indireta, oferece alguns inconvenientes como a subjetividade do operador durante a leitura, número limitante de amostras, por ser extenuante ao leitor e nem sempre é muito específica (BÖSE et al., 1995), bem como em algumas situações, os animais podem apresentar resultados positivos sem apresentar a infecção, como no caso de anticorpos colostrais em animais jovens ou quando tenham sido esterilizados por quimioterapia (JOHNSTON et al., 1973; MAHONEY, et al., 1979).

A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) permite a confirmação da presença e a discriminação dos parasitos quando em níveis muito baixos no sangue de animais portadores sadios, sendo fundamental para a elaboração de programas de controle da doença (ALMERIA et al., 2001).

Azambuja et al. (1994) afirma que através da PCR, é possível diferenciar *B. bovis* de *B. bigemina* e outros hemoparasitos dos bovinos, devido à alta especificidade da técnica. Segundo Madruga et al. (2002), através da PCR foi possível diferenciar e caracterizar, geneticamente e antigenicamente, os isolados de *B. bigemina*, em cinco regiões fisiográficas diferentes do Brasil, contribuindo para estudos epidemiológicos deste hemoparasito, bem como o desenvolvimento de vacinas de subunidade.

Serqueira et al. (2005) utilizaram a técnica de PCR para estimar a taxa de infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* no sangue de bovinos, em fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, bem como em ovos deste ácaro. A alta especificidade e sensibilidade analítica da PCR tornaram esta técnica uma ferramenta valiosa para realizar estudos epidemiológicos em uma determinada região, permitindo traçar medidas de controle eficazes, principalmente em casos de infecções latentes nos bovinos (FIGUEROA et al., 1992).

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

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

McGuire et. al. (1991) consideravam que a utilização de antígenos purificados, livres dos contaminantes de hemácias, aumentaria a especificidade de todos os métodos sorológicos, tais como, fixação de complemento (FC), aglutinação em cartão (CT), aglutinação em tubo capilar (CTA) reação imunoenzimática (ELISA), imunofluorescência Indireta (IFI), imunobloting e radioimunoensaio.

No entanto, nas últimas décadas, as técnicas baseadas em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) têm substituído as demais técnicas sorológicas (BARROS et al., 2005) em função das vantagens que apresenta. Além de

possibilitar a análise de um grande número de amostras, trata-se de uma metodologia que elimina erros da avaliação subjetiva (MADRUGA et al., 2000a) pela possibilidade de leitura automatizada (SOARES, 2001). O teste imunoenzimático de ELISA é capaz de detectar e quantificar a presença de anticorpos em baixas concentrações. O antígeno solúvel purificado, produzido a partir de amostras de sangue com 80% de parasitemia de *A. marginale*, é adsorvido pela placa de poliestireno (DUZGUN et al., 1988; MADRUGA et al., 1996). A reação imunoenzimática do ELISA é utilizada para detecção rápida de antígeno ou anticorpo. Utiliza pequena quantidade de reagente depositado em um ponto sobre discos de nitrocelulose com afinidade por proteína, havendo formação de cor após a reação anticorpo antígeno-específico e antianticorpo ligado à enzima e pela adição de um substrato cromogênico precipitável, facilmente visualizado. O teste pode ser empregado na titulação e triagem de soros, com sensibilidade semelhante a imunofluorescência indireta (PAPPAS, 1988; MONTENEGRO-JAMES et al., 1990).

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

Apesar da indiscutível relevância das técnicas imunológicas, há particularidades na epidemiologia das infecções por *A. marginale* cuja investigação não pode ser assistida por essas técnicas. Um desses aspectos diz respeito à necessidade de se definir os parâmetros quantitativos da transmissão da rickettsia, que dependem da detecção do parasito tanto no hospedeiro vertebrado como nos invertebrados (CAVALCANTE, 2007).

Os primeiros avanços científicos obtidos com a aplicação das provas baseadas na detecção de DNA de *A. marginale* foram revisados por diversos autores (BARBET, 1995; FIGUEROA & BUENING, 1995; STILLER & COAN, 1995). Nessas publicações os autores descrevem o progresso das técnicas de

biologia molecular e as conseqüentes descobertas que propiciaram em relação a essa rickettsia.

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

A facilidade com que *T. vivax* é transmitido por meio de uma variedade de insetos vetores limita ainda mais a possibilidade de definir a sua ocorrência em determinadas zonas com base na presença de insetos vetores específicos. Portanto, a detecção de *T. vivax* no sangue de animais infectados é o único meio confiável de diagnóstico (MASAKE et al., 1997). Embora possa ocorrer em bovinos infectados com outras espécies de tripanosomas, um exame cuidadoso de esfregaços sanguíneos finos corados com Giemsa é mais provável para revelar a presença de infecções mistas de tripanosomas (GARDINER, 1989). O grande cinetoplasto de *T. vivax* é, em si, uma característica valiosa para o diagnóstico, uma vez que facilita a identificação em esfregaços sanguíneos (HOARE, 1972).

No entanto, o diagnóstico de infecções por *T. vivax* continua a ser um desafio, especialmente porque a parasitemia é frequentemente muito baixa na maioria das infecções. Microscopia tem sido tradicionalmente empregada na identificação positiva deste parasito (WOO 1971; MURRAY et al. 1977). No entanto, a escassez de tripanossomas no sangue dos animais infectados cronicamente limita a utilização das técnicas parasitológicas isoladamente no diagnóstico. Isto tem provado ser extremamente difícil no campo de estudos para examinar a prevalência da tripanossomíase (NANTULYA 1990).

Técnicas moleculares de diagnóstico, como a PCR geralmente têm provado ser ferramentas muito específicas e sensíveis. A PCR é baseada na amplificação de milhões de cópias de uma região específica do genoma de qualquer organismo, utilizando-se uma enzima DNA-polimerase termoestável, oligonucleotídeos livres e seqüências de oligonucleotídeos iniciadores (primers),

em um tampão contendo substâncias que favorecem a reação (FIGUEROA et al., 1992; BÖSE et al., 1995; FIGUEROA et al., 1996).

A PCR é capaz de detectar quantidades tão pequenas quanto 1 pb de DNA (BÖSE et al., 1995), e consiste na utilização de sequências iniciadoras internas às utilizadas na PCR, ou seja, que anelem ao fragmento amplificado pela PCR em uma segunda bateria de amplificação, aumentando ainda mais o número de cópias da sequência alvo e conseqüentemente a sensibilidade do teste (FIGUEROA et al., 1996). Além disso, a PCR foi capaz de detectar claramente DNA de tripanossoma no sangue de bovinos após 3-4 dias de administração (CLAUSEN et al., 1999). A PCR também tem sido proposto como uma ferramenta para estudos retrospectivos para detectar DNA de tripanossoma diretamente no soro (DESQUESNES, 1997). Apesar de sua sensibilidade e de uso generalizado, a PCR ainda não foi utilizada para estudos epizootiológicos de tripanosomíases de gado no Brasil (DÁVILA et al., 2003).

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

Embora a avaliação de um surto de tripanosomíase (NS Barbosa Jr et al. Comunicação pessoal), utilizando-se esfregaços sanguíneos e PCR, detectaram *T. vivax* no sangue de um bezerro que morreu logo após o nascimento. A baixa sensibilidade do método parasitológico adotado pode contribuir para as diferenças nos resultados (OSÓRIO, 2008).

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

Outras técnicas diagnósticas mais refinadas têm sido aplicadas para estudar *T. vivax* na América do Sul, como a análise de isoenzimas (DIRIE, et al. 1993) e técnicas moleculares baseadas em ácidos nucleicos (DESQUESNES & TRESSE 1996). A avaliação de isolado de *T. vivax* na América do Sul (DESQUESNES & TRESSE 1996) através da PCR produziram excelentes resultados, quando comparado com outras técnicas diagnósticas. Métodos moleculares, porém, não são satisfatórios para a utilização em larga escala no campo (DWINGER & HALL, 2000), que exige bons e equipados laboratórios, equipe bem treinada, e reagentes caros, e muitas vezes tóxicos, alguns dos quais são cancerígenos.

O objetivo do presente trabalho foi determinar a soroprevalência de *B. bovis*, *B. bigemina*, *A. marginale* e realizar o diagnóstico parasitológico e molecular do *T. vivax* na Regional de Pedreiras, MA.

**1.2 Capítulo 2: Artigo 1: Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* in cattle from Pedreiras Basin, Maranhão State, Brazil.**

ERICEIRA-BARROS, A.C., COSTA, F.B., MELO, S.A., CARVALHO-NETA, A.V., SANTOS, H.P., PEREIRA, H.M., CHAVES, N.P., BEZERRA, D.C, ABREU-SILVA, A.L. AND GUERRA, R.M.S.N.C.\*

Corresponding author:

Adress:

\* Rita M.S.N.C. GUERRA

E-mail adress: [grita62@hotmail.com](mailto:grita62@hotmail.com)

Departamento de Patologia – Universidade Estadual do Maranhão

Cidade Universitária Paulo VI – Avenida Lourenço Vieira da Silva, s/n

Zip Code: 65055-970

São Luís Maranhão, Brazil

## ABSTRACT

This research was aimed to study seroepidemiological aspects of bovine babesiosis and anaplasmosis at the Pedreiras Basin, State of Maranhão, as well as obtain information about these diseases situation in the population. The detection of antibodies against *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* was carried out by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. Bovine blood samples were collected from cattle herds from Pedreiras, Bernardo do Mearim, Igarapé Grande and Trizidela do Vale municipalities. A total of 158 blood samples were collected, this number was determined by a mathematical model. From the total of samples 156 (98.7%), 157 (99.4%) and 158 (100%) were seropositive for *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale*, respectively. There was not significant statistical difference among the four municipalities studied. It was possible to conclude that Pedreiras Basin is in a situation of enzootic stability for babesiosis and anaplasmosis, which indicate a risk of economic losses when susceptible animals from enzootic instability or free regions are introduced in the studied area.

Keywords: Babesiosis; Anaplasmosis; Maranhão

## 1 INTRODUCTION

Bovine babesiosis and anaplasmosis are hemoparasitic diseases responsible for economical losses due to reduction in meat and milk yield and the application of control measures. They also have impact on international cattle trade (Bock et al, 2004). These diseases are generally characterized by severe anemia that leads to mortality in non-immune herds.

In Brazil bovine babesiosis is caused by the protozoans *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* and bovine anaplasmosis by the rickettsia *Anaplasma marginale*. They are tick-borne diseases whose vector is *Boophilus microplus*. However *A. marginale* can also be transmitted mechanically by hematophagous diptera (Guglielmone, 1995).

Babesiosis and anaplasmosis are typical disease from tropical areas where the prevalence is above 50% and in some places it could reach 90% (Tonnesen et al. 2006, Lopez et al. 2008). Generally the seroprevalence of bovine babesiosis and anaplasmosis in Brazil is high varying from region to region (Barros et. al., 2005, Guedes Júnior et al., 2008; Araújo, 1997; Barci et al., 1994; Madruga et al., 1983; Santos et al., 2001). However the lower seroprevalence for *B. bovis* was registered in the South region (Osaki et al., 2002) and for *A. marginale* in the North (Guedes Junior et al., 2008) even though been over 60%.

The aim of this paper was to determine the seroprevalence of bovine babesiosis and anaplasmosis in cattle from Pedreiras Basin and characterize the epidemiological situation of these diseases in the studied area.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Characterization of studied area**

This work was performed in Pedreiras Basin, which is composed by four municipalities (Pedreiras, Bernardo do Mearim, Igarapé Grande and Trizidela do Vale). This Basin is located in Medio Mearim Region in the middle center of Maranhão State, the climate ranges 27 °C to 37 °C and it presents two distinct period: rainy (January to May) and dry (June to December).

### **2.2 Sampling**

The size of the cattle population studied was determined through a mathematical model developed by Pan American Zoonosis Center (1979) for epidemiological study of chronic diseases. The formula is as follows:  $n = p (100-p) Z^2 / (d.p/100)^2$ , where  $n$  = sample number,  $p$  = expected prevalence,  $Z$  = degree of confidence, and  $d$  = error margin. The minimal sampling confers 95% of confidence degree and 3% of error probability.

Five milliliters of blood samples were obtained from each animal from caudal vein using vaccum tubes. The serum obtained was stored at -20°C until the serological analysis. A total of 158 animals (145 females and 13 males), dairy

cattle, and crossbred were sampled according to the following age groups: under 3 years old, 3 to 7 years old and over 7 years old.

### **2.3 Detection of antibodies against *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale***

Serum samples were analyzed by Indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) with crude antigens of *B. bovis* and *B. bigemina* previously described by Madruga et al. (2000 and 2001). For detection of antibodies against *A. marginale* a recombinant major surface protein 5 (rMSP5) was used (Silva et al., 2006).

## **3 RESULTS**

Of the 158 samples screened from Pedreiras Basin 156 (98.7%) were positive for *B. bovis* 157 (99.4%) for *B. bigemina* and 158 (100%) for *A. marginale*. The prevalence of seropositive animals in each municipality is summarized in Table 1. No statistical difference was observed among the studied municipalities. In regard to the sex, age, breed and frequency of antibodies against *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale* no statistical difference was also observed (Table 2).

A high mortality due to acute babesiosis was reported in a farm from Bernardo do Mearim municipality where it was used an acaricide for tick control during approximately four months.

#### 4 DISCUSSION

Bovine babesiosis have been reported though out Brazil, including all geographical regions (Araújo, 1997; Sousa et al., 2000, Santos et al., 2001; Osaki et al., 2002; Guedes Júnior et al., 2008). Studies on anaplasmosis have been performed in the Southeastern South, and Northeastern regions (Souza et al., 2001, Vidoto et.al., 1998, Oliveira et al., 1992). This is the first report of *Babesia* spp. and *A. marginale* for Maranhão State.

A high frequency of seropositive animals was detected so Pedreiras Basin can be classified as an area of enzootic stability for *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale* once the cattle displayed an efficient immunological response able to control the infection. This finding suggests a high rate of the transmission of these hemoparasites by the vector indicating that the environmental conditions are suitable for the vector life cycle as observed in other Brazilian states (Barros et al., 2005). Previous studies in Brazil showed that there are different epidemiological situations, areas that can be characterized as enzootic stable and instable ones. Many factors must be considered such as cattle breed, vector population and management in the use of acaricide.

According to Perry (1996) endemic stability is defined as the state where the relationship between host, agent, vector and environment is such that clinical disease occurs rarely or not at all. In one sampled farm a high bovine mortality was notified after acaricide use. Studies showed that excessive use of acaricides and rotational grazing appears to be related to outbreaks of babesiosis especially in dairy cattle (Guglielmone, 1995). Jonsson et al. (2008) reported that the effects of

acaricides application on the probability of the disease are unpredictable and depend on the existing inoculation rates of the time of introduction of acaricide or intensification of acaricide application. Thus in an endemic area is necessary to establish an equilibrium in which the tick numbers are sufficient to maintain low-level infection in the cattle and hence immunity to babesiosis.

Despite of having a high prevalence for these agents in this survey the literature reports that *B. indicus* cattle and their crosses are more resistant to the infection with *B. bovis* and *B. bigemina* than *B. taurus* cattle. The susceptibility of *B. indicus* cattle and their crosses to infection with *A. marginale* is similar to the *B. taurus* cattle (Jonsson et al., 2008).

It is concluded that the studied area is of enzootic stability and outbreaks of babesiosis and anaplasmosis are not expected however it represents a potential risk of economic losses when susceptible animals from instability areas or free ones area introduced.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq and Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão-FAPEMA. Ericeira-Barros, A.C and Costa, F.B. were supported by scholarship program FAPEMA and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES. We thank Dr Flávio Ribeiro Araújo from EMBRAPA for the laboratory assistance.

## REFERENCES

- Araújo, F.R., Madruga, C.R., Almeida, M.A.O., Leal, C.R.B., Miguita, M., 1997. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no estado da Bahia pela imunofluorescência indireta e teste de congutinação rápida. *Rev. Bras. de Parasit. Vet.*, 6(2), 111-115.
- Barci, L. A. G.; Oliveira, M. R.; Machado, R. Z. et al., 1994. Epidemiologia da babesiose bovina no Estado de São Paulo: I. Estudo em rebanhos produtores de leite tipo B do município de Pindamonhangaba, Vale do Paraíba. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.3, n.2, p. 79-82.
- Barros, S.L., Madruga, C.R., Araújo, F.R., Menk, C.F., de Almeida, M.A., Melo, E.P., Kessler RH., 2005. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* n.100,v.6, 513-517.
- Bock, R.E., Jackson, L., de Vos, B., Jorgensen, W.K., 2004. Babesiosis of cattle,. *Parasitology* 129 (Suppl.), S247–S269.
- Centro Pan-Americano de Zoonosis 1979. Procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo. Ramos Mejia, Buenos Aires. Nota Técnica 18, 35 pp.
- Guedes Junior, D.S.G., Araújo, F.R., Silva, F.J.M., Rangel, C.P., Neto, J.D.B., Fonseca, A.H., 2008. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* AND *Borrelia burdgorferi* in cattle from

- the Northeastern Region of the State Of Pará, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17(2), 105-109.
- Guglielmone, A.A., 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* 57, 109–119.
- Jonsson, N.N., Bock, R.E., Jorgensen, W.K., 2008. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet Parasitol.* 155(1-2), 19
- Lopez, M., Figueroa, J.V., Ramos, J.A., Mosqueda, J.J., Rojas, E., Vega, C.A., Alvarez, J.A. 2008. Infection seroconversion of susceptible animals introduced into babesiosis endemic area. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 1149: 131-135.
- Madrugá, C. R.; Aycardi, E.; Putt, N. 1983., Epidemiologia da anaplasmosose e babesioses em bovinos da Região do Cerrado do Estado do Mato grosso do sul: I – Prevalência. *Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoot.*, .35 (5), 631-640.
- Madrugá, C.R., Araújo, F.R., Marques, A.P.C., Carvalho, C.M.E., Cusinato, F. Q., Crocci, A. J., Kessler, R.H., Miguita, M., 2000. Desenvolvimento de uma prova de imunoadsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. **Pesq. Vet. Brasil.** 20(4), 167-170.
- Madrugá, C.R., Marques, A.P.C., Araújo, F.R., Miguita, M., Carvalho, C.M.E., Araújo, F. S., Umaki, A.C.S., Crocci, A.J., Queiroz, R.A., 2001. Evaluation of na ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and application in na epidemiological survey in Brazil. **Pesq. Vet. Brasil.** 21(2), 72-76

- Oliveira, A.A., Pedreira, P.A.S., Almeida, M.P.R.S., 1992. Doença de bezerras I.Epidemiologia da anaplasmosose no estado de Sergipe. Arq. Bras.Med. Vet. Zoot., 44 (5), 377-387.
- Osaki, S. C.; Vidotto, O.; Marana, E. R M.; Vidotto, M. C.; Yoshihara, E.; Pacheco, R. C.; Igarashi, M.; Minho, A. P. 2002. Ocorrência de anticorpos anti *Babesia bovis* e estudo sobre a infecção natural em bovinos da raça nelore, na região de Umuarama, Paraná, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 11 (2), 77-83.
- Perry, B.D., 1996. Epidemiological indicators and their application to the control of tick-borne diseases. In Manual on Tick and Tick-borne Disease Control. Rome, FAO.
- Santos, H.Q., Linhares, G.F.C., Madruga, C.E., 2001. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos leiteiros da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e ELISA. *Ciência Animal Bras.*, 2(2), 133-37.
- Silva, V.M., Araújo, F.R., Madruga, C.R., Soares, C O., Kessler, R. H., Almeida, M.A.O., Fragoso, S.P., Santos, L.R., Ramos, C.A.N., Bacanelli, G., Torres Júnior, R.AA. 2006. Comparison between indirect enzyme-linked immunosorbent assays for *Anaplasma marginale* antibodies with recombinant major surface protein 5 and initial body antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101, 511-516.
- Souza, J. C. P de Soares, C. O. Madruga, C. R. Massard, C. L., 2001. Prevalence of antibodies against *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in cattle in the Medio Paraiba mesoregion, Brazil. *Ciencia Rural.* 31 (2), 309-314

- Souza, J.C.P., Soares, C.O., Massard, C.L., Scofield, A., Fonseca, A.H., 2000. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. *Pesq Vet Brás.* 20, 97-101.
- Tonnesen, M.H., Penzhorn, B.L., Bryson, N.R., Stoltsz, W.H., Masibigiri, T., 2006. Seroprevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in the Soutpansberg region, Limpopo Province, South Africa, associated with changes in vector tick populations. *J S Afr Vet Assoc.* 77(2), 61-5
- Vidotto, M.C., Vidotto, O., Andrade, G.M., Palmer, G., McElwain, T., Knowles, D.P., 1998. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* on cattle in Parana State, Brasil, by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann N Y Acad Sc,* 849, 424-426.

Table 1 - Frequency of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from Pedreiras Basin – Maranhão State/Brazil

Municipality	Hemoparasites		
	<i>Babesia bovis</i>	<i>Babesia bigemina</i>	<i>Anaplasma marginale</i>
Pedreiras	97.3 %	97.3 %	100 %
Bernardo do Mearim	97.4 %	100 %	100 %
Igarapé Grande	100 %	100 %	100 %
Trizidela do Vale	100 %	100 %	100 %

Table 2 – Frequency of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* antibodies by sex, age group and breed in cattle from Pedreiras Basin – Maranhão State/Brazil

Variable		Frequency					
		<i>B. bovis</i>		<i>B. bigemina</i>		<i>A. marginale</i>	
		SP (NT)	%	SP (NT)	%	SP (NT)	%
Sex	M	13 (13)	100	13 (13)	100	13 (13)	100
	F	143 (145)	98.6	144 (145)	99.3	145 (145)	100
Age group	<3	30 (31)	100	31 (31)	100	31 (31)	100
	>3 <7	97 (98)	99	97 (98)	99	98 (98)	100
	>7	29 (29)	100	29 (29)	100	29 (29)	100
Cattle	<i>Bos indicus</i> crosses	38(39)	97.4	39(39)	100	39(39)	100
	<i>Bos taurus</i> crosses	118(119)	99.2	118(119)	99.2	119(119)	100
Media		156 (158)	98.7	157 (158)	99.4	158 (158)	100

SP (seropositive); NT (number of samples)

**1.3 Capítulo 3: Artigo 2: Diagnóstico parasitológico e molecular do *Trypanosoma vivax* na regional de Pedreiras, Maranhão, Brasil**

ERICEIRA-BARROS, A. C.; COSTA, F. B.; MELO, S. A., CARVALHO-NETA, A. V., BATISTA, Z. S, ANDRADRE, F. H. E.; GUERRA, R. M. S. N. C.; ABREU-SILVA, A. L\*

Autor correspondente:

Endereço

\* Abreu-Silva AL

E-mail: [anabreu@ioc.fiocruz.br](mailto:anabreu@ioc.fiocruz.br)

Departamento de Patologia – Universidade Estadual do Maranhão

Cidade Universitária Paulo VI – Avenida Lourenço Vieira da Silva, s/n

Zip Code: 65055-970

São Luís Maranhão, Brazil

## ABSTRACT

In Brazil, the bovine tripanossomiasis is mainly caused by *Trypanosoma vivax*. Among the infected animals, the bovines are considered more susceptible and this susceptibility varies among the breeds. In the Maranhão State there is just one register in Itapecuru Mirim, a municipality nearby the capital to the state, thus it is necessary to investigate the occurrence of this disease in other municipalities chiefly in dairy herd. The aim of this paper was to diagnose the occurrence of *T. vivax* Pedreiras basin, using parasitological and molecular exam. Sample of 177 animals were obtained from twenty farms distributed in four municipalities that compose the Pedreiras Basin. The results showed that 3.39% of the animals were positive for parasitological exam and 6.21% of animals were positives for molecular method. This finding showed that PCR is more sensitive, which corroborate that method is very useful in epidemiological survey.

Words key: Tripanossomiasis, *Trypanosoma vivax*, parasitemia, PCR

## RESUMO

No Brasil, a tripanossomíase bovina é principalmente causada pelo *Trypanosoma vivax*. Entre os animais infectados, os bovinos são considerados mais sensíveis e essa sensibilidade varia entre as raças. No Estado do Maranhão, há apenas um registro em Itapecuru Mirim, um município próximo à capital do Estado, portanto, é necessário investigar a ocorrência desta doença em outros municípios principalmente no rebanho leiteiro. O objetivo deste trabalho foi o de diagnosticar a ocorrência de *T. vivax* na regional de Pedreiras, utilizando exames parasitológicos e moleculares. Amostras de 177 animais foram obtidas de vinte fazendas distribuídas em quatro municípios que compõem a regional. Os resultados mostraram que 3,39% dos animais foram positivos para o exame parasitológico e 6,21% dos animais foram positivos para o método molecular. Esse achado mostrou que PCR é mais sensível, confirmando que esse método é muito útil na investigação epidemiológica.

Palavra- chave: Tripanossomíases, *Trypanosoma vivax*, parasitemia, PCR

## INTRODUÇÃO

As tripanossomíases são causadas por espécies do gênero *Trypanosoma* que pertencem ao filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida, cuja principal característica é a presença da organela chamada “cinetoplasto” localizada na base do flagelo, onde é encontrado DNA mitocondrial (VICKERMAN, 1976). Pouco se sabe sobre a origem e evolução dos Kinetoplastidas devido a falta de registros fósseis, por isso os dados disponíveis na literatura são meras especulações (SILVA et al., 2002)., Entretanto, com o uso das modernas ferramentas moleculares e as informações genéticas a evolução começou a ser elucidada.

O *T. vivax* infecta um grande número de espécies de ungulados selvagens e domésticos. Na África é o responsável pela tripanossomíase em equinos, bovinos e outros ruminantes. Os camelos são também suscetíveis ao *T. vivax*, cães e suínos são refratários ao mesmo (SILVA et al., 2002).

De acordo com Mulla & Rickman (1988), como resultado da sua co-evolução, tripanosomas são muitas vezes não patogênicos em animais selvagens; e, do mesmo modo, algumas raças de bovinos permanecem relativamente saudáveis e produtivas em áreas onde ocorrem tripanossomíases transmissíveis por insetos hematófagos segundo descrito por Murray et al. (1979). Embora estes animais tornem-se infectados, são mais resistentes à patogenicidade consequentes da infecção do que outras raças. Naturalmente gado resistente à doença é conhecido como trypanotolerantes e inclui *Bos taurus* (OSÓRIO et al.; 2008). Em áreas onde existe um elevado risco de infecção, gado trypanotolerante continua a crescer e reproduzir, enquanto gado zebu (*Bos indicus*) torna-se caquético, fraco, propenso ao aborto, e frequentemente vem a óbito (MURRAY et al. 1982). No entanto, ambas as raças de bovinos são altamente suscetíveis à infecção por cepas de *T. vivax* (WILLIAMS et al. 1992).

Silva et al (2002) afirmam que o *T. vivax* é encontrado em toda a área ocupada pela mosca tsé-tsé na África. No Oeste da África o *T. vivax* é

considerado o mais patogênico e importante tripanosoma que afeta os bovinos. Ele, contudo, tem se expandido para outras áreas da África, América Central, América do Sul e Caribe devidos a ocorrência da ação de outros insetos hematófagos como os tabanídeos.

A primeira ocorrência do *T. vivax* nas Américas foi observada na Guiana Francesa em 1919 e mais tarde em outros países da América do Sul, Central, e algumas ilhas do Caribe (SILVA et al., 2002).

No Brasil, a ocorrência do *T. vivax* foi mencionada pela primeira vez por Boulhosa (1946) em bovinos da zona bragantina no Estado do Pará. Posteriormente, Shaw e Lainson (1972) descreveram o parasito em um búfalo (*Bubalus bubalis*) nas proximidades da cidade de Belém, Pará. Outros relatos sobre *T. vivax* foram feitos também por Serra-Freire (1981), em ovinos e bovinos, no Oiapoque, Amapá; em búfalos no Amapá, por Serra-Freire (1983). Na região Centro-Oeste, foram feitos relatos do parasita em bovinos no Pantanal de Poconé no estado do Mato Grosso (SILVA et al. 1995, 1996) e no Pantanal do Mato Grosso do Sul no município de Miranda (PAIVA et al., 1997). No Maranhão existe apenas um registro em Itapecuru Mirim, município próximo à capital do estado (GUERRA et al., 2008).

Com o alto fluxo de animais devido à comercialização entre os países sul-americanos, fazem-se necessárias mais informações sobre esta doença nos animais de produção, partindo do princípio de que o diagnóstico das infecções por *T. vivax* é um desafio em função da baixa parasitemia observada na maioria das infecções, reforçando-se a importância da necessidade do conhecimento da epidemiologia desta enfermidade, aliado ao fato de não haver dados para o estado do Maranhão que nos permita avaliar o impacto desta parasitose. O objetivo do presente trabalho foi realizar o levantamento epidemiológico dos casos de infecções pelo parasito na regional de Pedreiras no Estado do Maranhão, zona propícia para o desenvolvimento do vetor, e comparar a sensibilidade de dois métodos diagnósticos.

## **METODOLOGIA**

### **Área de Estudo**

O projeto foi desenvolvido no município de Pedreiras, estado do Maranhão, localizado a uma latitude 04°34'08" sul e a uma longitude 44°35'31" oeste, estando a uma altitude de 60 metros, com a temperatura variando em torno dos 27 a 37 °C e o período chuvoso começando em janeiro indo até maio, sendo o resto do ano estiagem. Sua população estimada é de 30.049 habitantes. Possui uma área de 534,514 km<sup>2</sup>. Seu rebanho bovino efetivo é de 17.936 cabeças (IBGE, 2008).

### **Animais**

Os animais utilizados integram o rebanho leiteiro de 20 fazendas localizadas na regional de Pedreiras que é composta por quatro municípios: Bernardo do Mearim, Igarapé Grande, Pedreiras e Trizedela do Vale. No presente estudo foi utilizado 20% das vacas de cada fazenda resultando numa amostra de 177 vacas leiteiras.

### **Coleta de Sangue**

As coletas foram realizadas nos meses de julho e dezembro de 2008. Para realização de diagnósticos parasitológicos, amostras de sangue periférico, provenientes de vasos auriculares, foram colhidas em lâminas histológicas para a confecção de esfregaços sanguíneos e determinação direta da parasitemia em microscopia óptica. As amostras de sangue provenientes da punção da veia

jugular foram coletadas em tubos “vacutainer” com anticoagulante (EDTA) para a extração de DNA, e conservadas à temperatura de -70 °C.

Todas as amostras de sangue foram transportadas para o Laboratório de Anatomopatologia da UEMA, onde foram processadas.

### **Avaliação Parasitológica dos Animais**

Esfregaços sanguíneos foram preparados com sangue capilar, obtido por punção da ponta da orelha ou ponta da cauda, e posteriormente foram fixados em metanol e corados pelo método de GIEMSA.

A parasitemia de *Trypanosoma* spp. foi determinada, sob microscopia óptica de imersão, aumento de 1000X, pela percentagem de eritrócitos parasitados observados.

### **Métodos Moleculares**

#### **Extração do DNA**

A extração de DNA foi realizada com o sangue total empregando-se o kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (PROMEGA), seguindo-se as recomendações do fabricante para extração de DNA de 300µl de sangue.

#### **Reação em Cadeia da Polimerase – PCR**

As reações de PCR para *Trypanosoma* spp foram realizadas de acordo com Njiru et al. (2005), que amplifica um fragmento de 250pb de *T. vivax* do gene ITS1 do rDNA. Serão utilizados os iniciadores ITS1CF 5'

CCGGAAGTTCACCGATATTG 3' e ITS1BR 5' TTGCTGCGTTCTTCAACGAA 3' desenvolvido por Dávila (2002).

As reações foram processadas em tubos de 0,5mL empregando-se volume final de 25mL, sendo 4mL da solução de DNA das amostras teste e 21 mL de tampão de reação Master Mix (Promega) contendo 50 units/ml *Taq* DNA polymerase oferecidos em uma propriedade reação tampão (pH 8,5), 3,0mM MgCl<sub>2</sub>; 400µM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ; 1,5µM de cada iniciador (Invitrogen) e água livre de nuclease para completar o volume final. O material foi incubado em termociclador Biocycler, empregando-se a seguinte seqüência de ciclos: um passo inicial de 94 °C por cinco min., seguido de 35 ciclos de 94 °C por 40seg.; 58 °C por 40seg. e 72 °C por 40seg., finalizando com um passo a 72 °C por cinco min.

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de ágarose 1%. O gel será submetido à eletroforese e corado com uma solução de brometo de etídio (0,5mg/mL) por 15 minutos. A visualização dos produtos amplificados será realizada em transiluminador UV.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O exame parasitológico revelou que apenas 6 animais (3,39%) dos 177 examinados eram positivos para o *T. vivax* (Figura 01), sendo dois animais oriundos de uma fazenda localizada no Município de Pedreiras e quatro animais oriundos de duas fazendas (dois animais em cada) localizadas no Município de Igarapé Grande.

A PCR dessas amostras revelou que 6,21% (11) dos produtos amplificados foram positivos para *T. vivax* (Figura 02). Por esta técnica o Município de Trizidela do Vale foi o que apresentou o maior número de casos de animais positivos (45,45%), seguido dos municípios de Pedreiras (27,27%), Bernardo Mearim (18,18%) e Igarapé Grande (9,09%).

No Brasil os primeiros relatos da ocorrência do *T. vivax* foi registrados primeira vez por Boulhosa (1946) em bovinos no estado do Pará. Mais tarde Shaw e Lainson (1972) descreveram o parasito em um búfalo (*Bubalus bubalis*) nas proximidades da cidade de Belém, Pará. Posteriormente Serra-Freire (1981) descreve a ocorrência desse protozoário em ovinos e bovinos, no Oiapoque, Amapá; em búfalos no Amapá, por Serra-Freire (1983). Na região Centro-Oeste também foram registrados casos no Pantanal de Poconé no estado do Mato Grosso (SILVA et al. 1995, 1996) e no Pantanal do Mato Grosso do Sul no município de Miranda (PAIVA et al., 1997). Na região nordeste do Brasil, BATISTA et al. (2007) relataram um surto de tripanossomíase por *T. vivax* na Paraíba. LINHARES et al. (2006) descrevem pela primeira vez a ocorrência de *T. vivax* em Tocantins, em um rebanho que havia chegado de São Paulo.

Desde a década de oitenta sabia-se que o *T. vivax* circulava entre os rebanhos maranhenses, entretanto, o primeiro registro da ocorrência desse parasito no estado foi feito em 2008 por Guerra e colaboradores. Esses autores descrevem a doença em uma propriedade localizada no Município de Itapecuru, onde os bezerros apresentavam sinais clínicos de anemia, palidez de mucosa e um dos animais veio a óbito. Após a realização do exame parasitológico foi observado a presença de *T. vivax*. Segundo Jones & Dávila (2001), *T. vivax* no Novo Mundo é um exemplo de patógeno que se espalhou para além das suas áreas de distribuição original através da intervenção humana, tendo se disseminando por milhares de quilômetros entre a África e a América do Sul.

Ao que tudo indica o *T. vivax* não é endêmico no estado do Maranhão. Provavelmente os casos registrados no estado ocorreram devido a introdução de animais de áreas endêmicas, que ao serem introduzidos em uma área com abundância de vetores (Tabanídeos) e com animais suscetíveis, propiciou o desenvolvimento da infecção.

A comparação entre as técnicas evidenciou que a PCR foi mais sensível; mostrando que esta técnica fornece provas da existência de infecção em animais negativos pelos testes parasitológicos. Comprovadamente este método

apresenta um papel importante na detecção de animais que apresentam baixa parasitemia que seria indetectável por esfregaços ou Técnica de centrifugação do micro-hematócrito (MHCT). Resultados semelhantes foram obtidos por Dávila et al. (2003), que observaram maior positividade por esta técnica (44,7%) e apenas 0,5% pelo exame parasitológico.

Considerando-se o histórico da expansão da tripanossomíase por *T. vivax*, a economia em processo de globalização, com conseqüente comercialização de animais entre os países sul-americanos, faz-se necessário o aprimoramento do conhecimento desta doença nos animais de produção. Partindo do princípio de que o diagnóstico das infecções por *T. vivax* é um desafio em função da baixa parasitemia observada na maioria das infecções, reforça-se a importância da necessidade do conhecimento da soropidemiologia desta enfermidade, aliado ao fato de não haver dados para o estado do Maranhão que nos permita avaliar o impacto desta parasitose.

## REFERÊNCIAS

BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M.M.G. et al. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Vet. Parasitol.**, v.143, p.174-181, 2007.

BOULHOSA, J. L. **Boletim DEMA**, v., p., jul-nov., 1946.

DÁVILA, A. M. R. Tripanosomose animal na América do Sul: epizootiologia, evolução e tecnologias da informação. 2002. 288p. **Tese** (Doutorado)-Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.

D'AVILA, A. M. R.; HERRERA, H. M.; SCHLEBINGER, T.; SOUZA, S.S.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.117, p.1-13, 2003.

GUERRA, R. M. S. N. C.; FEITOSA JR, A. B.; SANTOS, H. P.; ABREU-SILVA, A. L.; SANTOS, A. C. G. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v 38, n 3, p. 833-835, mai-jun, 2008.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estimativas da população para 1º de julho de 2008** (29 de agosto de 2008).

JONES, T. W.; DÁVILA, A. M. *Trypanosoma vivax* - out of Africa. **Trends Parasitol.**, v.17, p.99-101, 2001.

LINHARES G. F. C.; DIAS FILHO F. C.; FERNANDES P. R.; DUARTE S. C.; Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins (Relato de caso). **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, p. 455-460, 2006.

MULLA, A. F.; RICKMAN, L. R. How do African game animals control trypanosome infections? **Parasitol Today**, v.4, p.352-354, 1988.

MURRAY, M.; CLIFFORD, D. J.; MCINTYRE, W. I. M. Diagnosis of African trypanosomiasis in the bovine. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.73, p.120-121, 1979.

MURRAY, M.; MORRISON, W. I.; WHITELAW, D. D. Host susceptibility to African trypanosomiasis: trypanotolerance. **Adv Parasitol**, v.21, p.1-68, 1982.

NJIRU, Z. K.; CONSTANTINE, C. C.; GUYA, S.; CROWTHER, J.; KIRAGU, J. M.; THOMPSON, R. C.; DAVILA, A. M. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. **Parasitol Res.**, v.95, n.3, p.186-192, 2005.

OSÓRIO, A. L. A. R.; MADRUGA, C. R.; DESQUENES, M.; SOARES, C. O.; RIBEIRO, L. R. R.; COSTA, S. C. G. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis and introduction in the New World – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v 103, n.1, p. 1-13. 2008.

PAIVA, F.; LEMOS, R. A. A.; OSHIRO, E. T.; SALVADOR, S. C.; NAKAZATO, L. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev Bras Parasitol Vet**, v.6 (Supp. I), p. 349, 1997.

SERRA-FREIRE, N. M. Oiapoque – outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.4, n.4, p.30-31, Rio de Janeiro out./dez.,1981.

SERRA-FREIRE, N. M. Reavaliação dos focos de *Trypanosoma vivax* em bovinos e bubalinos do Território Federal do Amapá (TFA). **Revista da Faculdade de Veterinária da UFF**, v.1, n.1, p.41-45, Rio de Janeiro, 1983.

SHAW, J.J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.66, p.25-32, 1972.

SILVA, R. A. M. S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. ***Trypanosoma evansi e Trypanosoma vivax: biologia, diagnóstico e controle***. Embrapa Pantanal, Corumbá, 1ed., 141p. , 2002.

SILVA, R. A.; DA SILVA, J. A.; SCHNEIDER, R. C.; DE FREITAS, J.; MESQUITA, T.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. Bovine Trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* in the Northern subregion of Pantanal, Brasil. **Trynews**, v.4, p.1-2, 1995.

SILVA, R. A. M. S.; DA SILVA, J. A.; SCHNEIDER, R. C.; DE FREITAS, J.; MESQUITA, D.; MESQUITA, T.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.91, p.561-562, 1996.

VICKERMAN, K. **The diversity of the kinetoplastid flagellates**. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Eds.). *Biology of the Kinetoplastida*. London: Academic Press, 1976, p.1-34.

WILLIAMS, D. J.; LOGAN-HENFREY, L. L.; AUTHIÉ, E.; SEELY, C.; McODIMBA, F. Experimental infection with a haemorrhage-causing *Trypanosoma vivax* in N'Dama and Boran cattle. **Scand J Immunol**, v.36 (Suppl. I), p.34-36, 1992.

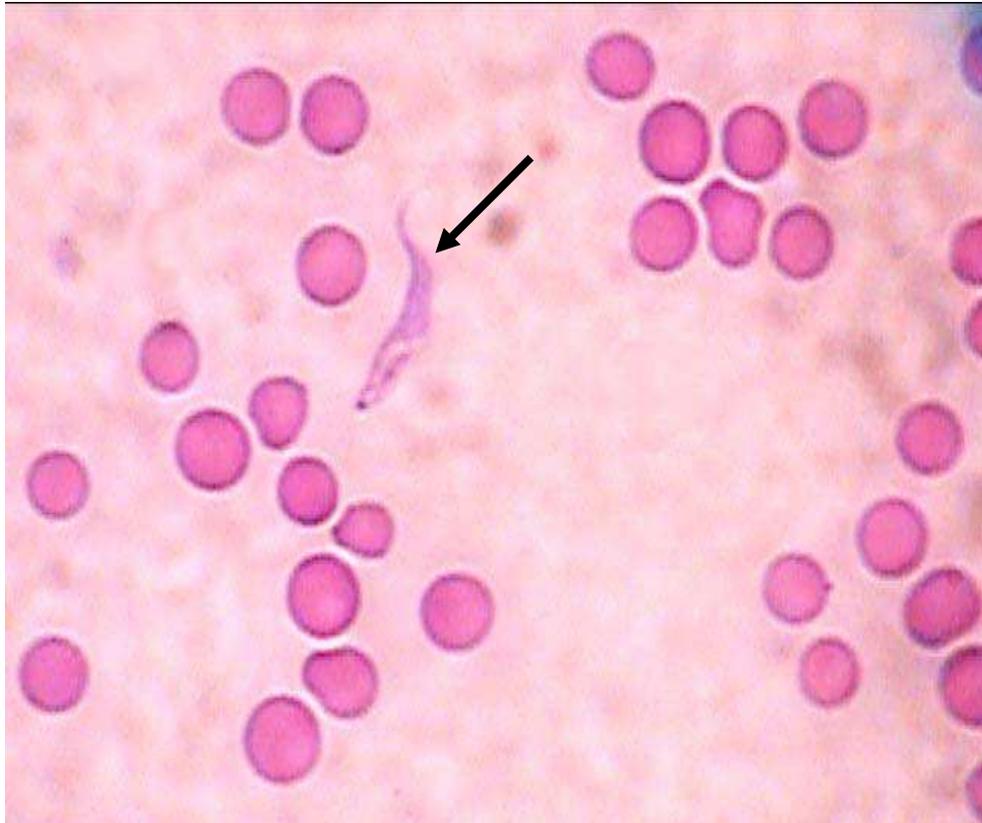


Figura 01. Esfregaço de sangue bovino oriundo da regional de Pedreiras-MA, evidenciando forma tripomastigota de *T. vivax* (seta). Coloração GIEMSA, objetiva de 40X.

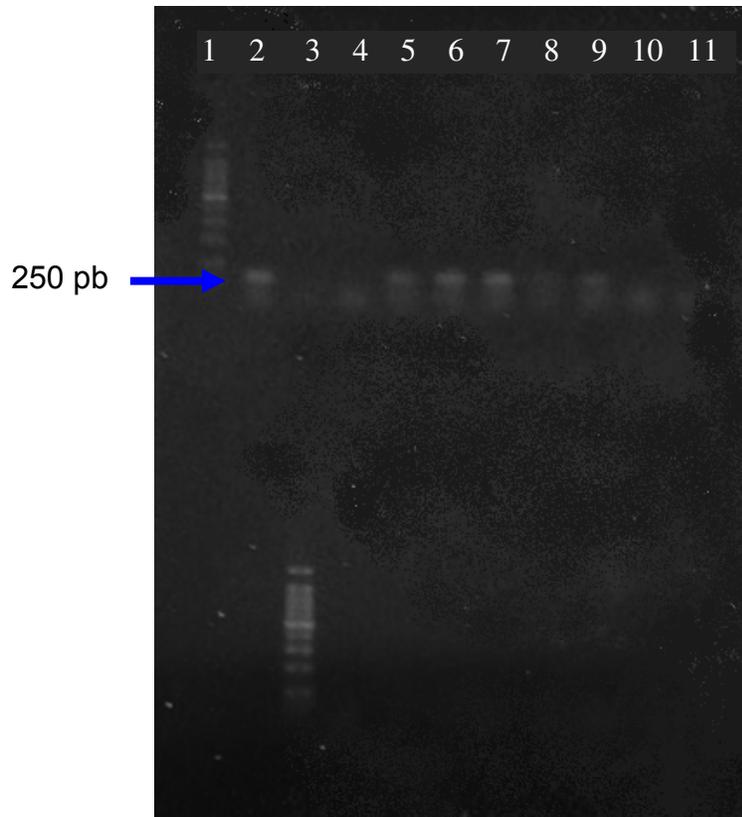


Figura 02. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Trypanosoma vivax* (250 pares de base-pb) pelas técnicas de PCR 1-Marcador de peso molecular; 2- Controle positivo; 3- Controle negativo; 5, 6, 7, 9 - Amostras positivas.

## 1.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- ✓ O *Trypanosoma vivax* foi o hemoparasita de menor frequência entre os rebanhos da região estudada;
- ✓ A reação em cadeia da polimerase é uma ferramenta eficiente na investigação epidemiológico do *T. vivax*;
- ✓ A regional de Pedreiras é uma área de estabilidade enzoótica para a tristeza parasitária bovina;
- ✓ As hemoparasitoses direta ou indiretamente causam prejuízos econômicos para a pecuária leiteira na regional de Pedreiras

## REFERÊNCIAS

AGUIRRE, D. H.; GAIDO, A. B.; VINABAL, A. E.; DE ECHAIDE, S.T.; GUGLIELMONE, A. A. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. **Parasite**, v.1, n.4, p.405-7, 1994.

ALDERINK, F. J.; DIETRICH, R. A. Economic and epidemiological implications of anaplasmosis in Texas beef cattle herds. **The Texas A&M University System**, Texas, B-1426, p.1-16, 1983.

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

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.

ALMERIA, S.; CASTELLÀ, J.; FERRER, D.; ORTUÑO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; GUTIÉRREZ, J. F. Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR - based and light microscopy detection. **Veterinary Parasitology**, v.99, p.249-259, 2001.

ALVAREZ, F.; CORTINAS, M. N.; MUSTO, H. The analysis of protein coding genes suggests monophyly of *Trypanosoma*. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.5, p.333-343, 1996.

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

ARTECHE, C.C.P. Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil. Uso de cepas atenuadas de *Babesia* spp. e de cepa heteróloga de *Anaplasma*. **A Hora Veterinária**, n. 66, p. 39-42, 1992.

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

BAKER, J. R. Speculations on the evolution of the family Trypanosomatidae Doflein, 1901. **Experimental Parasitology**, New York, v.13, p.219, 1963.

BARBET, A. F. Recent developments in molecular biology of anaplasmosis. **Vet Parasitol.**, v.57, p.57, 43-49, 1995.

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

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

BATISTA, J.S.; RIET-CORREA, F.; TEIXEIRA, M.M.G. et al. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. **Vet. Parasitol.**, v.143, p.174-181, 2007.

BENAVIDES, M.V.; SACCO, A.M.S. Differential *Bos taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection. **Veterinary parasitology**, v. 150, p. 54-64, 2007.

BERCHTHOLD, M.; PHILIPPE, H.; BREUNIG, A.; BRUGEROLLE, G. The phylogenetic position of *Dimastigella trypaniformis* within the parasitic kinetoplastids. **Parasitology Research**, Berlin, v.80, p.672-679, 1994.

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

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

BOCK, R; JACKSON, L; DE VOS, A. J; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitol.**, v.129 (Suppl.), p247-69, 2004.

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

BOULHOSA, J. L. **Boletim DEMA**, v., p., jul-nov., 1946.

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

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, 2006b.

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

CAVALCANTE, G. G. **Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em bezerros da raça Nelore no Estado de São Paulo** / Botucatu: [s.n.], 2007. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

CLAUSEN, P.H.; WIEMANN, A.; PATZELT, R.; KAKAIRE, D.; POETZSCH, C.; PEREGRINE, A.; MEHLITZ, D. Use of a PCR assay for the specific and sensitive detection of *Trypanosoma* spp. in naturally infected dairy cattle in peri-urban Kampala, Uganda. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.849, p.21–31, 1998.

CLAUSEN, P.H.; WAISWA, C.; KATUNGUKA-RWAKISHAYA, E.; SCHARES, G.; STEUBER, S.; MEHLITZ, D. Polymerase chain reaction and DNA probe hybridization to assess the efficacy of diminazene treatment in *Trypanosoma brucei*-infected cattle. **Parasitol. Res.**, v.85, p.206–211, 1999.

CORDOVES, C. O.; FERNANDEZ, C.; GARCIA, A. J.; GONZALEZ, B. R. *Trypanosoma vivax*, Ziemann, 1905. Lista de transmisores mecanicos en Cuba. **Rev Cub de Cien Vet** 13: 219-221, 1982.

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

D´AVILA, A. M. R. Tripanosomose animal na América do Sul: epizootiologia, evolução e tecnologias da informação. 2002. 288p. **Tese** (Doutorado)-Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.

D´AVILA, A. M. R.; HERRERA, H. M.; SCHLEBINGER, T.; SOUZA, S.S.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.117, p.1–13, 2003.

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

DESQUESNES, M. Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme-linked immunosorbent assay. **Acta Trop.**, 65, 139–148, 1997.

DESQUESNES, M. **Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America**, OIE & CIRAD, Paris, 190 p., 2004.

DESQUESNES, M.; GARDINER, P. R. Épidémiologie de la trypanosome bovine (*Trypanosoma vivax*) en Guyane Française. **Rev Elev Med Vet Pays Trop**, v.46, p.463-470, 1993.

DESQUESNES, M.; TRESSE, L. Evaluation de la sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation des échantillons sanguins. **Rev Elev Med Vet Pays Trop**, v.49, p.322-327, 1996.

DESQUESNES, M.; DIA, M. L. *Trypanosoma vivax*: Mechanical transmission in cattle by one of the most common African tabanids, *Atylotus agrestis*. **Exp Parasitol**, v.103, p.35, 2003.

DESQUESNES, M.; DIA, M. L. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. **Vet Parasitol** 119: 9-19, 2004.

DESQUESNES, M.; DIA, M. L.; ACAPOVI, G.; YONI, W. Les vecteurs mécaniques des trypanosomoses animaux. Généralités, morphologie, biologie, impacts et contrôle. **Identification des espèces les plus abondantes en Afrique de l'Ouest**, Edition CIRDES, Imp. de l'Avenir, Ouagadougou, Burkina Faso, 70 pp, 2005.

DICKIN, S. K.; GIBSON, W. C. Hybridisation with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.33, p.135–142, 1989.

DIRIE, M. F.; OTTE, M. J.; THATTHI, R.; GARDINER, P. R. Comparative studies of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* isolates from Colombia. *Parasitology*, v.106, p.21-29, 1993.

DUZGUN, A.; SCHUNTNER, C. A.; WRIGHT, I. G. *et al.* A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infections. *Vet Parasitol*, v.29, p.1-7, 1988.

DWINGER, R. H.; HALL, M. J. R. Trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* in ruminants in Latin America - a review. In 51-58 International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria (eds), **Animal Trypanosomiasis: Diagnosis and Epidemiology**, Backhuys Publishers, The Netherlands, p. 50-55, 2000.

ENGLUND, P. T.; GUILBRIDE, D. L.; HWA, K-Y.; JOHNSON, C. E.; LI, C.; ROCCO, L. J.; TORRI, A. F. Kinetoplast DNA: structure and replication. In: SMITH, D. F.; PARSONS, M. **Molecular biology of parasitic protozoa**. [S.l.]: IRL Press, p.88-114, 1996.

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

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.

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

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

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

FIGUEROA, J. V.; BUENING, G. M. Nucleic acid probes as a diagnostic method for tickborne hemoparasites of veterinary importance. **Vet Parasitol.**, v.57, n.1-3, p.75-92, 1995.

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

FINELLE, P. African animal trypanosomiasis; Part IV. Economic Problemes. **Wild. Anim. Rev.**, v.110, p.15-18, 1974.

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

FRIEDHOFF, K.T. Transmission of Babesia. In: **RISTIC, M. Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Ratón, Florida: CRC Press, Inc., 1988. Cap. 2, p. 23-52.

FUTSE, J. E.; UETI, M. W.; KNOWLES, D. P. JR.; PALMER, G. H. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. **J. Clin. Microbiol.** v.41, n.8, p.3829-34, 2003.

GARDINER, P. R. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. **Adv Parasitol** 28: 229-317, 1989.

GASSER, R. B. PCR-based technology in veterinary parasitology. **Vet Parasitol.**, v.84, p.229-258, 1999.

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

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- $\alpha$ -dependent nitric oxide production from bovine mononuclear phagocytes exposed to *Babesia bovis* merozoites. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.84, p.237-251, 2002.

GOMES, A. O. *Boophilus microplus*. In: KESSLER, R.H. & SCHENK, M.A.M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Gado de Corte. p.10-46, 1998.

GONÇALVES, M. P. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, vol.30, n°1, Santa Maria, Jan./Mar., 2000.

GONÇAVES-RUIZ, P. M.; PASSOS, L. M.; PATARROYO, J. H.; RIBEIRO, M. F. Antigenic characterization of morphologically distinct *Anaplasma marginale* isolates using a panel of monoclonal antibodies. **Vet Parasitol.**, v.29, n.107, p.169-77, 2002.

GUERRA, R. M. S. N. C.; FEITOSA JR, A. B.; SANTOS, H. P.; ABREU-SILVA, A. L.; SANTOS, A. C. G. Biometry of *Trypanosoma vivax* found in a calf in the state of Maranhão, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v 38, n 3, p. 833-835, mai-jun., 2008.

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; AGUIRRE, D. H.; GAIDO, A. B. Vacunas congeladas contra la babesiosis y la anaplasmosis de los bovinos: viabilidad luego de la descongelación. **Revista Cubana de Ciências Veterinarias**, v. 22, n.3, p. 233-240, 1991.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America, **Vet. Parasitol.**, v 57, p. 109-19, 1995.

HAAG, J.; O'HUIGIN, C.; OVERATH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.91, p.37-49, 1998.

HART, L. T.; MORRIS, N. G.; BESSIN, R.; LEPRINCE, D. J.; TODD, W. J.; ENRIGHT, F. M.; LUTHER, D. G. Single step technique for staining *Anaplasma marginale* in bovine blood smears. **Am. Journal Vet. Res.**, v.53, n.10, p.1732-1733, 1992.

HASHIMOTO, T.; NAKAMURA, Y.; KAMAISHI, T.; ADACHI, J.; NAKAMURA, F.; OKAMOTO, K.; HASEGAWA, M. Phylogenetic place of kinetoplastid protozoa inferred from a protein phylogeny of elongation factor 1 alpha. . **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.70, p.181-185, 1995.

HOARE, C. A. **The trypanosomes of mammals: a zoological monograph.** Oxford: Blackwell, 1972. 749p.

HOOF, L.; VAN HENRARD, C.; PEEL, E. Quelques observations sur les trypanosomes des grands mammifères au Congo Belge. **Acta Trop**, v.5, p.327, 1948.

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.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estimativas da população para 1º de julho de 2008** (29 de agosto de 2008).

JONES, T.W.; DÁVILA, A.M. *Trypanosoma vivax* - out of Africa. **Trends Parasitol.**, v.17, p.99-101, 2001.

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

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

KINABO, L. D. B. Pharmacology of existing drugs for animal trypanosomiasis. **Acta Trop**, v.54, p.169-183, 1993.

KIMETO, B. A.; MUGERA, G. M.; NYAGA, P. N. Haemorrhagic pancarditis in cattle infected with *Trypanosoma vivax*. **Vet Parasitol.**, v.34, p.295-301, 1990.

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

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

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

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; GARCIA-GARCIA, J. C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitol.**, v.129, p.285-300, 2004.

KOCAN, K. M.; YOSHIOKA, J.; SONENSHINE, D. E.; DE LA FUENTE, J.; CERAUL, S. M.; BLOUIN, E. F.; ALMAZAN, C. Capillary tube feeding system for studying tick pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). **J Med Entomol.**, v.42, n.5, p.864-74, 2005.

KREIER, J. P.; GOTHE, R.; IHLER, G. M.; et al. The hemotrophic bacteria: The Families Bartonellaceae and Anaplasmataceae. In: BALOWS, A.; TRUPER, H. G.; DOWORKIN, M.; et al. **The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications**. 2ed.; New York: Springer-Verlag, 1991. Cap.225, p.3994-4022.

KUKLA, B. A.; MAJIWA, P. A. O.; YOUNG, J. R.; MOLOO, S. K.; OLE MOIYOI, O. K. Use of species-specific DNA probes for detection and identification of trypanosome infection in tsetse flies. **Parasitology**, v.95, p.1-16, 1987.

KURT, O.; GIRGINKARDESLER, N. Babesiosis. **Turkive Parazitoloji Dergisi**, v.25, n.1, p.94-98, 2001.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **The Leishmaniases in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. p.1-120.

LAVIER, G. L'evolution de la morphologie dans le genre *Trypanosoma*. **Ann. Parasitol.**, v.19, p.168, 1943.

LEGER, L. Les affinités de l'*Herpetomonas subulata* et la phylogénie des trypanosomes. **C R Soc. Biol.**, v.67, p.615, 1904.

LEVINE, N. D. The hemoflagellates. In ND Levine, **Protozoan parasites of domestic animals and of man**, 2nd ed., Burgess Publishing, Minneapolis, p. 36-78, 1973.

LEVINE, N. D. Progress in taxonomy of the apicomplexan protozoa. **J. Protozoology**. v.35, n.4, nov. 1988.

LIMA, J. D. Premunção: uma alternativa para o controle da tristeza parasitária. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 7, 1991, São Paulo. **Anais...** São Paulo: CBPV, 1991. p. 39-43.

LINHARES G.F.C., DIAS FILHO F.C., FERNANDES P.R. & DUARTE S.C. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins (Relato de caso). **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, p. 455-460, 2006.

LOSOS, G. J. **Infectious tropical diseases of domestic animals**. Harlow Essex: Longman Scientific and Technical, p. 938, 1986.

LOSOS, G. J.; IKEDE, B. O. Review of pathology of diseases in domestic and laboratory animals caused by *T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v.9, p.1-17, 1972.

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.

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

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, 1986. 40p. il. (EMBRAPA-CNPGC. **Circular Técnica**, n.18).

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

MADRUGA, C. R.; MARQUES, A. P. C.; MIGUITA, M. et al. A preliminary evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against *Anaplasma marginale*. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15, 1996, Campo Grande. MS. **Anais...** Campo Grande: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, MS, 1996. 458p. p.297.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; MARQUES, A. P. C.; CARVALHO, C. M. E.; CUSINATO, F. Q.; CROCCI, A. J.; KESSLER, R. H.; MIGUITA, M. Desenvolvimento de uma prova de imunoadsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. **Pesq. Vet. Bras.**, v.20, p.167-170, 2000a.

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

MADRUGA, C. R.; MARQUES, A. P. C.; ARAÚJO, F. R.; MIGUITA, M.; CARVALHO, C. M. E.; ARAÚJO, F. S.; UMAKI, A. C. S.; CROCCI, A. J.; QUEIROZ, R. A. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and application in an epidemiological survey in Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.21, p.72-76, 2001.

MADRUGA, C. R.; LEAL, C. R. B.; FERREIRA, A. M. T.; ARAÚJO, F. R.; BONATO, L. V.; KESLER, R. H.; SCHENK, M. A. M.; SOARES, C. O. Genetic and antigenic analysis of *Babesia bigemina* isolates from five geographical regions of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n.4, p.153-160, 2002.

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

MAHONEY, D.F; WRIGHT, I.G; MIRRE, G.B; Bovine babesiosis: the persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infections. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.67, p. 197-203, 1973.

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

MAJIWA, P. A. O.; MASAKE, R. A.; NANTULYA, V. M.; HAMERS, R.; MATTHYSSENS, G. *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*: Identification of two karyotypic groups. **EMBO Journal**, v.4, p.3307–3313, 1985.

MAJIWA, P. A. O.; WEBSTER, P. A repetitive deoxyribonucleic acid sequence distinguishes *Trypanosoma simiae* from *T. congolense*. **Parasitology**, v.95, p.543–558, 1987.

MARCHE, S.; ROTH, C.; PHILIPPE, H.; DOLLET, M.; BALTZ, T. Characterization and detection of plant trypanosomatids by sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.71, p.15-26, 1995.

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

MARTINS, J. R.; CORRÊA, B. L. Babesiose e anaplasnose bovina: aspectos destas enfermidades. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.1, n.1, p.51-58, 1995.

MASAKE, R. A.; MAJIWA, P. A. O.; MOLOO, S. K.; MAKAU, J. M.; NJUGUNA, J. T.; MAINA, M.; KABATA, J.; OLE-MOIYOI, O. K.; NANTULYA, V. M. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. **Experimental Parasitology**, v.85, p.193–205, 1997.

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

McGUIRE, T. C.; DAVIS, W. C, BRASSFIELD, A. L.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serum antibody to isolated MSP-3. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, n.4, p.788-93, 1991.

MELÉNDEZ, R. D.; FORLANO, M.; FIGUEIROA, W. Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. **J Parasitol** 79: 293-294, 1993.

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

MINCHIN, E. A. Investigations on the development of trypanosomes in tsetse flies and other Diptera. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, Essex, v.52, p.159, 1908.

MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R.W. The parasites. In D.H. MOLYNEUX; R. W.; ASHFORD. **The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals**, 1<sup>st</sup> ed., Taylor & Francis, London, p. 3-62, 1983.

MONTENEGRO-JAMES, S.; GUILLE, A. T.; TAPANG, P. et al. Use of the dot enzyme-linked immunosorbent assay with isolated *Anaplasma marginale* initial bodies for serodiagnosis of anaplasmosis in cattle. **Am J Vet Res**, v.51, n.10, p.1518-1521, 1990.

MULLA, A. F.; RICKMAN, L. R. How do African game animals control trypanosome infections? **Parasitol Today**, v.4, p.352-354, 1988.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.**, v.55, p. 335-50, 1987.

MURRAY, M.; MURRAY, P. K.; MCINTYRE, W. I. M. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis., v.71, p.325–326 **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1977.

MURRAY, M.; CLIFFORD, D. J.; MCINTYRE, W. I. M. Diagnosis of African trypanosomiasis in the bovine. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.73, p.120-121, 1979.

MURRAY, M.; MORRISON, W. I.; WHITELOW, D. D. Host susceptibility to african trypanosomiasis: trypanotolerance. **Adv Parasitol**, v.21, p.1-68, 1982.

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

MWONGELA, G. N.; KOVATCH, R. M.; FRAZIL, M.A. Acute *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle in Coast Province, Kenya. **Trop Anim Health Prod**, v.13, p.63-69, 1981.

NANTULYA, V. M. Trypanosomiasis in domestic animals: The problems of diagnosis. **Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v.9, p.357–367, 1990.

NASCIMENTO, M. D. do; PINHEIRO, J. G.; RIBEIRO, M. F. B. Alterações do quadro eritrocitário e sideremia de bezerros portadores de anaplasnose. Niterói, RJ: **Comunicado Técnico PESAGRO-RIO**, 97, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, p.1-2, 1981.

NJIRU, Z. K.; CONSTANTINE, C. C.; GUYA, S.; CROWTHER, J.; KIRAGU, J. M.; THOMPSON, R. C.; DAVILA, A. M. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. **Parasitol Res.**, v.95, n.3, p.186-192, 2005.

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

OGWU, D.; NURU, S. Transplacental transmission of trypanosomes in animals and man. **Vet Bull** 51: 381-384, 1981.

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, n. 1, p. 1-12, 1985.

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

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

OSÓRIO, A. L. A. R.; MADRUGA, C. R.; DESQUENES, M.; SOARES, C. O.; RIBEIRO, L. R. R.; COSTA, S. C. G. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis and introduction in the New World – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v 103(1), p. 1-13. 2008.

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

OTTE, M. J.; ABUABARA, J.Y. Transmission of South American *Trypanosoma vivax* by the neotropical horsefly *Tabanus nebulosus*. **Acta Trop.** 49: 73-76, 1991.

OTTE, M. J.; ABUABARA, J.Y.; WELLS, E. A. *Trypanosoma vivax* in Colombia: epidemiology and production losses. **Trop Anim Health Prod** 26: 146-156, 1994.

OVERATH, P.; HAAG, J.; LISCHKE, A.; O'HUIGIN, C. The surface structure of trypanosomes in relation to their molecular phylogeny. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v.31, p.468-471, 2001.

PAINE, G. D.; MILLER, A. S. Anaplasmosis in a newborn calf. **Vet Rec.**, v.15 n.3. p.58, 1977.

PAIVA, F.; LEMOS, R. A. A.; OSHIRO, E. T.; SALVADOR, S. C.; NAKAZATO, L. Ocorrência de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev Bras Parasitol Vet**, v.6 (Supp. I), p. 349, 1997.

PALMER, G. H.; BROWN, W. C.; RURANGIRWA, F. R. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. **Micro. Infect.**, v.2, n.2, p.167- 76, 2000.

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

PAPPAS, M. G. Recent applications of the Dot-ELISA in immunoparasitology. **Vet Parasitol.**, n.29, p.105-129, 1988.

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

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

PENCHENIER, L.; DUMAS, V.; GREBAUT, P.; REIFENBERG, J.M.; CUNY, G. Improvement of blood and gut processing for PCR diagnosis of trypanosomosis, **Parasite**, v.3, p.387–389, 1996.

PEREGRINE, A.S. Chemotherapy and Delivery Systems: Haemoparasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.54, p.223-248, 1994.

PERRY, B. D.; RANDOLPH, T. F.; McDERMOTT, K. R.; SONES, K. R.; THORNTON, P. K. Investing in animal health research to alleviate poverty. **ILRI (International Livestock Research Institute)**, Nairobi, Quênia, 2002. 148p.

PLATA, R. Nota preliminar sobre una trypanosomiasis del ganado vacuno en Bolívar. **Rev Med Vet Bogota**, v.3, p.77-79, 1931.

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

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

RAYMOND, H. L. *Tabanus importunus*, vecteur mécanique experimental de *Trypanosoma vivax* en Guyane Française. **Ann Parasitol Hum Comp.** 65: 44-46, 1990.

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

RISTIC, M. Anaplasmosis. In: RISTIC, M.; McINTYRE, I. Diseases of cattle in the tropics - economic and zoonotic relevance. **Current topics in veterinary medicine and animal science.** The Hague/Boston/London, v.6, p.327-344, 1981.

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

ROBERTS, L.W.; WELLDE, B.T.; REARDON, M.J.; ONYANGO, F.K. Mechanical transmission of *Trypanosoma brucei rhodesiense* by *Glossina morsitans morsitans* (Diptera: Glossinidae). **Ann Trop Med Parasitol.**, v.83, p.127-131, 1989.

ROEDER, P. L.; SCOTT, J. M.; PEGRAM, R. G. Acute *Trypanosoma vivax* infection of Ethiopian cattle in the apparent absence of tsé-tsé. **Trop Anim Health Prod**, v.16, p.141-147, 1984.

RUIZ-MARTINEZ, C. Les trypanosomioses au Venezuela. Progrès obtenus dans la lutte et la prophylaxie de la maladie. **Bull Off Int Epizoot.**, v.76, p.275-89, 1971.

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

SCOLES, G.A; BROCE, A.B; LYSYK, T.J; PALMER, G.H. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **J Med Entomol.**, v.42, n.4, p.668-75, 2005.

SHAW, J.J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.66, p.25-32, 1972.

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

SERRA-FREIRE, N. M. Oiapoque – outro foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.4, n.4, p.30-31, Rio de Janeiro out./dez.,1981.

SERRA-FREIRE, N. M. Reavaliação dos focos de *Trypanosoma vivax* em bovinos e bubalinos do Território Federal do Amapá (TFA). **Revista da Faculdade de Veterinária da UFF**, v.1, n.1, p.41-45, Rio de Janeiro, 1983.

SHAW, J.J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.66, p.25-32, 1972.

SILVA, R. A.; DA SILVA, J. A.; SCHNEIDER, R. C.; DE FREITAS, J.; MESQUITA, T.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. Bovine Trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* in the Northern subregion of Pantanal, Brasil. **Trynews**, v.4, p.1-2, 1995.

SILVA, R. A. M. S.; DA SILVA, J. A.; SCHNEIDER, R. C.; DE FREITAS, J.; MESQUITA, D.; MESQUITA, T.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R.; PEREIRA, M. E. B. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.91, p.561-562, 1996.

SILVA, R. A. M. S.; SEIDL, A.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. ***Trypanosoma evansi e Trypanosoma vivax: biologia, diagnóstico e controle***. Embrapa Pantanal, Corumbá, 1ed., 141p. , 2002.

SILVA, R. A. M. S.; PELLEGRIN, A. O.; LIMA, E. S. S.; RAMIREZ, L.; DÁVILA, A. M. R. **Abortos por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Mato-Grossense e Bolívia**, Embrapa Pantanal, Corumbá, 1 ed., 30p., 2004.

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

SOARES, C.O.; SOUZA, J.C.P.; MADRUGA, C.R.; MADUREIRA, R.C.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 75-79, 2000.

SOUZA, M. C. Estudo de infecções experimentais por *Trypanosoma (Duttonella) vivax* Ziemann 1905, em animais domésticos, MSc **Thesis**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 110 pp., 1980.

SOUZA, E. A. Geração e análise de GSS (genome survey sequences) de *Trypanosoma vivax*, 2005. **Dissertação** (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2005.

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

STEVENS, J. R.; GIBSON, W. The molecular evolution of trypanosomes. **Parasitology Today**, Essex., v.15, p.432-437, 1999.

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

SUAREZ, M.H., ALONSO, M.C.; PELAEZ, R.M.; SANCHES, B.P., BRAVO JR, G.; SANCHEZ A.S. Pesquisaje de Babesia en trabajadores Cubanos, agropecuarios y donantes en la provincia de Ciego de Avila. **Rev. Med. Tropical**, n.49, n.2, p.130-135, 1997.

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

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

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

TUNTASUVAN, D.; SARATAPHAN, N.; NISHIKAWA, H. Cerebral trypanosomiasis in native cattle. **Vet Parasitol.**, v.31, p.357-363, 1997.

UILENBERG, G. *Babesia*- A historical overview. **Vet. Parasitol.**, v138, n.1-2, p3-10, 2006.

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

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAR, J. L. et al. **Parasitologia Veterinária**, 2ºed., p.186., ed. Guanabara Koogan, São Paulo, 1996.

VALLI, V. E. O.; FORSBERG, C. M. The pathogenesis of *Trypanosoma congolense*. Quantitative histological changes. **Vet Pathol.**, v.16, p.334-368, 1979.

VAN DEN BOSSCHE, P.; SHUMBA, W.; MAKHAMBERA, P. The distribution and epidemiology of bovine trypanosomosis in Malawi. **Vet Parasitol**, v. 88, p.163-176, 2000.

VAN DEN INGH, T. S.; NEIJS-BAKKER, M. H. Pancarditis in *Trypanosoma vivax* infection in cattle. **Tropenmed Parasitol.**, v.30, p.239-243, 1979.

VICKERMAN, K. **The diversity of the kinetoplastid flagellates**. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Eds.). *Biology of the Kinetoplastida*. London: Academic Press, 1976. p.1-34.

VIDOTTO, O.; MCELWAIN, T. F.; MACHADO, R. Z.; PERRYMAN, L. E.; SUAREZ, C. E.; PALMER, G.H. *Babesia bigemina*: identification of B cell epitopes associated with parasitized erythrocytes. **Exp Parasitol.**, v 81, n 4, p.491-500, 1995.

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

VIEIRA, M. I. B.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R.; SACCO, A. M. S.; SILVA, J. G. C. Resposta imune humoral contra *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) em bovinos submetidos a distintas estratégias de controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.11, n.2, p.71-6, 2002.

VOHRADSKY, F. Signes cliniques, taux d'infestation journaliers, modifications hématologiques et pathomorphologiques sur du bétail infesté, **Rev Elev Med Vet Pays Trop.**, v.24, p.251-263, 1971.

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

WALLACE, F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Experimental Parasitology**. New York, v.18, p.124-193, 1966.

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

WELLS, E. A. The importance of mechanical transmission in the epidemiology of nagana. **Trop Anim Health Prod** 4: 74-88, 1972.

WHITELAW, D. D.; GARDINER, P. R.; MURRAY, M. Extravascular foci of *Trypanosoma vivax* in goats: the central nervous system and aqueous humor of the eye as potential sources of relapse infections after chemotherapy. **Parasitology**, v.7, p.51-61, 1988.

WIEMER, E. A. C.; HANNAERT, V.; VAN DEN IJSSEL, P.; VAN ROY, J.; OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A.M. Molecular analysis of glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase in *Trypanoplasma borelli*: an evolutionary scenario of subcellular compartmentation in Kinetoplastida. **Journal of Molecular Evolution**. New York, v.40, p.443–454, 1995.

WILLIAMS, D. J.; LOGAN-HENFREY, L. L.; AUTHIÉ, E.; SEELY, C.; McODIMBA, F. Experimental infection with a haemorrhage-causing *Trypanosoma vivax* in N'Dama and Boran cattle. **Scand J Immunol**, v.36 (Suppl. I), p.34-36, 1992.

WOO, P. T. K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis. **Acta Tropica**, Basel, v.27, n.4, p.384-386, 1970.

WOO, P. T. K. Evaluation of the haematocrit centrifuge and other techniques for the field diagnosis of human trypanosomiasis and filariasis. **Acta Tropica**, v.28, p.298–303, 1971.

WRIGHT, I.G.; GOODGER, B.V.; BUFFINGTON, G.D.; CLARK, I.A.; PARRODI, F.; WALTISBUHL, D.J. Immunopathophysiology of babesial infections. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 83, supplement, 11-13, 1989.

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

**ANEXOS**

## **Guide for Authors Veterinary Parasitology**

An international scientific journal and the Official Organ of the American Association of Veterinary Parasitologists (AAVP), the European Veterinary Parasitology College (EVPC) and the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP).

*Original research papers* should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form *Review articles* should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest.

They may be submitted or invited. *Rapid Communications* should contain information of high 'news'/scientific value worthy of very rapid publication. Rapid Communications should be submitted to the journal as such (i.e. clearly labelled as a RC) and should, in general, not exceed 2000 words in length. Upon receipt, they will be subject to rapid assessment and if accepted, published with priority.

*Short Communications* should consist of original observations or new methods within the scope of the journal. Reports of observations previously published from different geographical areas may be accepted only if considered sufficiently unusual or noteworthy. The Communications should be concise with the minimum of references, and cover no more than four pages of the journal; they need not be formally structured as are full papers, but should give sufficient methods and data necessary for their comprehension.

*Letters to the Editor* offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

### **Submission of manuscripts**

Submission to *Veterinary Parasitology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetpar>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to [AuthorSupport@elsevier.com](mailto:AuthorSupport@elsevier.com). Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System. Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not

being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

### **Acknowledgements**

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

### **Conflict of interest**

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

### **Role of the funding source**

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

### **Ethics**

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: [http://www.cioms.ch/frame\\_1985\\_texts\\_of\\_guidelines.htm](http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm). Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Parasitology*.

## Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

*Language Editing:* Elsevier's Authors Home provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. Authors should also be aware that *The Lucidus Consultancy* [edit@lucidusconsultancy.com](mailto:edit@lucidusconsultancy.com) offers a bespoke service to putative contributors to Veterinary Parasitology who need to arrange language improvement for their manuscripts. For more information about language editing services, please email [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com).

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions  <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s):

Complete postal address(es) of affiliations Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author Present address(es) of author(s) if applicable Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4). Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s)).

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

### **Abstracts**

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.

### **Tables**

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.

3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.

4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.

5. Each table should have a brief and self-explanatory title.

6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.

7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

### **Illustrations**

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.

2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.

3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.

5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.

6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.  
*Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.*
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

## **Preparation of supplementary data**

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published free of charge online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

## **References**

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. *For periodicals*

Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.

b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical*

Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruyssen, J. (Ed.), *Doramectin – a novel avermectin*. *Vet. Parasitol.* 49, 45–50.

c. *For books*

Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.d.

*For multi-author books*

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Parasitol.*

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

## **Formulae**

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca<sup>2+</sup>, not as Ca<sup>++</sup>.
6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. <sup>18</sup>O.
7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

### Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information into the normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

### Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.
5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are requested to follow the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299–326).

### Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail [healthpermissions@elsevier.com](mailto:healthpermissions@elsevier.com). Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

### **Authors Rights**

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>).

### **Proofs**

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate

PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Author Services**

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113, [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com).

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <http://www.elsevier.com/locate/vetpar>. For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

***Veterinary Parasitology* has no page charges**

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS PESQUISA VETERINARIA BRASILEIRA

- Objective and editorial policy
- Presentation of manuscripts

Objective and editorial policy

**Pesquisa Veterinária Brasileira** is aimed to publish the results of original research in order to contribute to the support of animal health, which most depends on the knowledge about veterinary prophylaxis and control.

Published monthly, **PVB** publishes original works and review articles in the field of veterinary pathology in its general sense, mainly relating to diseases of economic significance and of interest to public health.

Although the journal does not accept short communications in the form of scientific notes, there is no minimum limit of pages for a submitted work. However, it should present enough information about the experiments or the methodology used in the study.

Three copies of the work written in Portuguese or in English should be sent to the editor at the address below, together with a diskette (preferably prepared in MS-Word 7.0). All works should present the results of research which were not published and are not being considered for publication by other journal.

Although the concepts and opinions expressed in the works are responsibility of the authors, the editor, with the assistance of the Advisory board, reserves the right to suggest or request all necessary or recommendable changes.

### **Presentation of manuscripts**

1. Works should be arranged, if possible, in the following order: Title, Abstracts (both in English and Portuguese), Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions (or combinations of these last three items), Acknowledgements, and References.

a) Article's **title** should be concise, and point the work's content out;

b) **Abstracts** both in English and in Portuguese should be presented using active voice in the past. Abstracts should point out what was done and studied, as well as the most important results and conclusions. Indexing terms should be added at the final of each abstract. Authors should refer to the most recent issue of the journal to observe examples of abstracts.

c) The **introduction** should be brief, quote specific bibliographical citation (this should not assume the main importance of the item), and conclude with the work's objective.

d) **Material and Methods** should present all necessary data for other researchers to reproduce the work.

e) **Results** should concisely present all assembled data. Tables should only be prepared with relevant data, presenting averages of several repetitions, if appropriate. In some cases, it is suitable to express complex data through graphics, instead of presenting them in extensive tables.

f) In the **discussion**, the results should be discussed in relation to the literature. It is not recommended to mention works in progress or future plans, in order to avoid any author's and journal's obligation to publish them.

g) **Conclusions** should only be based on the results presented in the work.

h) **Acknowledgements** should be succinct, and should not appear in the text nor in footnotes.

i) The **reference** list, which should only include the bibliography cited in the work and the one that has served as secondary data sources, should be arranged in alphabetical order according to the surname of the first author. All author names and the title of each publication should be recorded. The title of the journal or work should also be cited in full or abbreviated, according to the rules of the Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT (Brazilian Association for Technical Standards), *Style Manual for Biological Journals* (American Institute for Biological Sciences) and / or *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (American Chemical Society, Washington, D.C.).

2. The preparation of the text should comply with the following rules:

a) all works should be typed double-spaced in only one side of the paper with margins of at least 2,5 centimetres; tables should be presented at the final of the work in separate sheets, using paper A4, if necessary; all pages should be consecutively numbered and ordered in text, captions, tables and figures;

b) the text should be the most concise possible, preferably using an impersonal language and the past tense; footnotes should be numbered consecutively in superscript Arabic numerals; footnotes should appear at the bottom of their respective pages; all tables and figures should be mentioned in the text, preferably by their identification number and following this numerical order; the abstracts should appear in a single paragraph, and should not quote bibliographical references;

c) author's professional address should appear as a footnote in the first page of the work;

d) all acronyms and abbreviations should appear within parentheses following their full names the first time they are mentioned in the text;

e) bibliographical citations should follow the form "author and year"; for works with two authors, both author names should be cited; for works with three or more authors, only the first name should be cited and followed by "et al." and the year; for works with same authors and year, a lower-case letter should be added to the year in order to differentiate them; all cited works should appear in full in the reference list, including those which have served as secondary data sources; however, secondary sources should not be cited in the text; this should be stated at the final of the reference list in the following form: "(Cited by Author 19..)"; the secondary sources should be cited only once in the reference list; personal communications and other unpublished data should be preferably cited within parentheses in the text, citing their titles and authors; the comma should not be used between author and year; the semicolon should not be used after the year; examples: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) reference list should be prepared with a minimum of punctuation, and without using capital letters; scientific names should be underlined, following the journal's style (please see the most recent issue), including the citation order of the bibliographical elements.

3. **Figures** (graphics, drawings, maps or photographs) should be presented in a bigger size (about 150%) to allow reductions. Use lettering or signals of sufficient size to be legible after reduction, when appropriate. No part should be typed. Magnification should be preferably indicated in the figure area; a title at the top of the figure should be avoided. Drawings should be made in black ink on white paper; do not use squared paper. Using a soft pencil, each figure should be identified at the margin or on the back with the author's name, the figure number and an arrow pointing to the top. Photographs should be presented in black and white glossy prints, and should not be mounted. Coloured slides should also be presented. Only in the case colour is essential for the complete understanding of the figures, their printing will be in colour. Do not use paper clips or staples; send figures in an envelope instead.

4. Figure's descriptive captions should contain sufficient information to make them standable. Captions should be presented in separate sheets, beginning with the title of the work.

5. **Tables** should be understandable without reference to the text. Each table should have a complete title. Vertical rules should not be used in tables; instead, two long lines should be used, one above and the other below the column headings; between these two lines, other shorter lines can be used to group columns. Footnotes should be indicated in alphabetical letters, restarting from *a* each new table. Footnotes should appear just below the respective table, separated by a short line at the left.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)