

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**TESE**

**Estudo Epidemiológico de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em Búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Rio de Janeiro**

**Fabíola do Nascimento Corrêa**

**2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Estudo Epidemiológico de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em Búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Rio de Janeiro**

**FABÍOLA DO NASCIMENTO CORRÊA**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Adivaldo Henrique da Fonseca**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2011

636.2089

C824e

T

Corrêa, Fabíola do Nascimento, 1980-  
Estudo epidemiológico de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Rio de Janeiro / Fabíola do Nascimento Corrêa - 2011.

115 f.: il.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 67-94.

1. Búfalo - Doenças - Epidemiologia - Teses. 2. *Borrelia burgdorferi* - Teses. 3. *Babesia* - Epidemiologia - Teses. I. Fonseca, Adivaldo Henrique da, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

Bibliotecário: \_\_\_\_\_

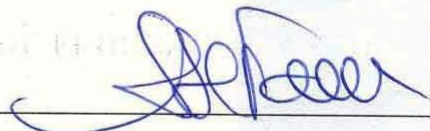
Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**FABÍOLA DO NASCIMENTO CORRÊA**

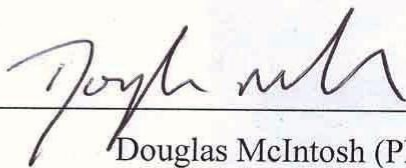
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM 17 / 02 / 2011.

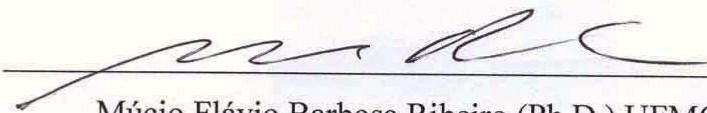


Adivaldo Henrique da Fonseca (Ph.D.) UFRRJ

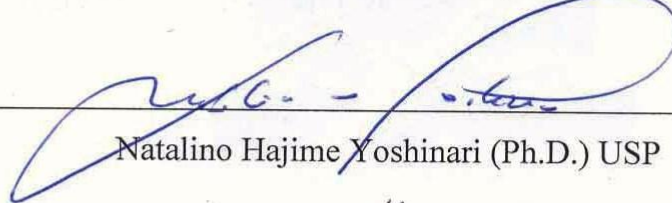
(Orientador)



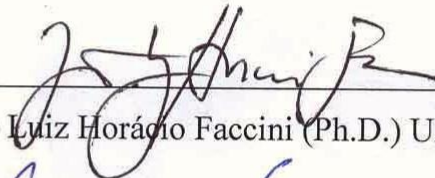
Douglas McIntosh (Ph.D.) UFRRJ



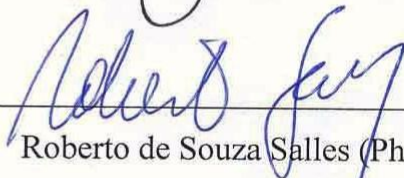
Múcio Flávio Barbosa Ribeiro (Ph.D.) UFMG



Natalino Hajime Yoshinari (Ph.D.) USP



João Luiz Horácio Faccini (Ph.D.) UFRRJ



Roberto de Souza Salles (Ph.D.) UFF



Raimundo Wilson de Carvalho (Ph.D.) FIOCRUZ

*Este trabalho é dedicado aos meus pais, Antônio Cláudio Gomes Corrêa e Josefa Bezerra do Nascimento Corrêa, a minha irmã Fernanda do Nascimento Corrêa, a minha avó Elvira Gomes Corrêa (in memoriam) e aos meus padrinhos Flávio Roberto Ramos e Marinaíra Alcidy Ramos, que sempre estiveram presentes em minha vida.*

*“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez.”*

*(Jean Cocteau)*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me permitir olhar para trás e perceber que nunca estive só.

Ao professor Dr. Aivaldo Henrique da Fonseca da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), por ter me recebido e apoiado durante esses nove anos de convívio.

À Prof<sup>a</sup>. Marília Massard da Fonseca, pelo carinho que sempre dedica aos alunos.

Ao Dr. Walter Flausino, à Dra. Raquel Silva Lisbôa e ao Dr. Douglas McIntosh, por terem sido os anjos da guarda deste trabalho. Obrigada pela disponibilidade, boa vontade e contribuição que tornou possível a realização deste trabalho.

A todos os proprietários que colaboraram e permitiram que este estudo fosse realizado, em especial ao Sr. Joaquim Valente Dias, pela amável recepção nas constantes visitas a sua propriedade durante a produção do soro hiperimune.

A todas as unidades da Emater e da Defesa Agropecuária do estado do Rio de Janeiro pelo apoio na localização e contato com os proprietários das fazendas.

Ao Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes e a toda equipe do Laboratório de Coccídeos e Coccidioses da UFRRJ, em especial à Gisele Santos de Meireles, Janaína da Soledad Rodrigues, Landreane Ramirez Gonçalves, integrantes da eficiente equipe de coleta a campo.

À Dr<sup>a</sup>. Nathalie Costa da Cunha da Fundação Oswaldo Cruz e aos doutores Natalino Hajime Yoshinari e Elenice Mantovani da Universidade de São Paulo, por todo apoio e colaboração na realização do diagnóstico molecular de *Borrelia burgdorferi*.

À Dr<sup>a</sup>. Maria Cecília Damé pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Clima Temperado/Pelotas-RS, pelo empenho em fornecer os controles negativos necessários para o ensaio sorológico realizado neste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ, Charles Passos Rangel, Jania de Rezende, Fábio Silva de Sousa, Bruna de Azevedo Baeta, Fábio Jorge Moreira da Silva, Antônio Amélia dos Santos Mucalane Tembue, Dasiel Obregon, Jenevaldo Barbosa da Silva, Rafaella Câmara Teixeira, Matheus Dias Cordeiro e Ana Carolina Nunes de Moraes, pela amizade, convivência e colaboração.

Ao técnico do Laboratório de Biologia Molecular do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, mestre Douglas Guedes Ferreira, pelo apoio técnico, amizade e companhia.

Ao técnico do Laboratório multiusuário de Biologia Molecular da Estação Parasitária W. O. Neitz da UFRRJ, Huarrisson Azevedo Santos, pelo auxílio prestado.

À Dr. Cristiane Divan Baldani, pelas preciosas sugestões para a melhoria deste trabalho.

Aos doutores Edson de Souza Balieiro e Leandro Azevedo Santos da UFRRJ, Guido Fontgalland Linhares da Universidade Federal de Goiás, Flávio Araújo e Carlos Ramos da Embrapa Gado de Corte – Campo Grande/MS, pela colaboração concedida.

À Embrapa Agrobiologia – Seropédica/RJ, em especial ao técnico Geraldo Cruz Baeta, pela disponibilidade dos equipamentos, além da atenção e vontade de ajudar.

A todos do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, pela convivência e aprendizado.

Aos animais que tanto contribuíram para a realização deste estudo.

À inesquecível UFRRJ pela acolhida durante o curso de Graduação e Mestrado e Doutorado.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica durante a graduação.

À CAPES pela concessão de bolsa durante o período de Mestrado e Doutorado.

A todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, muito obrigada!

## BIOGRAFIA

**Fabíola do Nascimento Corrêa**, filha de Antônio Cláudio Gomes Corrêa e Josefa Bezerra do Nascimento Corrêa, nasceu em cinco de Março de 1980, na cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro. Concluiu, em 1994, o ensino fundamental no Colégio Estadual Professora Isabel dos Santos Soares de Mello e o ensino médio na Associação Brasileira de ensino Universitário (ABEU), em dezembro de 1997, ambos localizados na cidade de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro.

No ano de 2000, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), colando grau e obtendo o título de Médica Veterinária em Fevereiro de 2005.

Durante o período acadêmico realizou estágios em diversas áreas, participando de projetos de pesquisa no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública. Participou de 33 publicações científicas, entre trabalhos em periódicos, congressos e outros eventos científicos.

Foi bolsista de iniciação científica (CNPq) de agosto de 2002 a fevereiro de 2005, junto a projetos de pesquisa na área de hemoparasitologia no Laboratório de Doenças Parasitárias do prédio da Sanidade Animal do convênio com a EMBRAPA/UFRRJ.

Em março de 2005 ingressou no mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, Área de Concentração Sanidade Animal, o qual concluiu em fevereiro de 2007. Neste mesmo ano, iniciou o doutorado, na mesma instituição, onde foi bolsista da CAPES até o presente momento. Nesta data, apresenta e defende esta tese como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.



## RESUMO

CORRÊA, Fábíola do Nascimento. **Estudo Epidemiológico de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em Búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Rio de Janeiro**. 2011. 99p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

O crescente interesse econômico sobre a bubalinocultura tem estimulado pesquisas a respeito da saúde bubalina. O presente estudo teve como objetivo verificar a frequência sorológica e molecular dos agentes *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* em búfalos do estado do Rio de Janeiro. Dezesete propriedades foram selecionadas, sendo pelo menos uma por microrregião com criatório bubalino no estado do Rio de Janeiro, nas quais o sangue dos bubalinos foi coletado por amostragem não probabilística. Foram utilizadas 316 amostras de soro e 295 amostras de DNA analisadas pelas técnicas de ELISA indireto e PCR, respectivamente. Para *B. burgdorferi* apenas as amostras de DNA dos 12 animais com maior soropositividade no ELISA foram submetidas à técnica de PCR. O teste sorológico revelou que 59,2% dos animais foram positivos para *B. burgdorferi*, 51,3% para *B. bovis*, 45,9% para *B. bigemina* e 42,0% para *A. marginale*. Não foi observada associação entre o sexo dos bubalinos e as frequências de animais positivos para todos os agentes ( $p > 0,05$ ), mas as fêmeas apresentaram maior capacidade de produção de IgG contra infecções por *B. burgdorferi*, *B. bigemina* e *A. marginale* ( $p < 0,05$ ). A idade dos animais mostrou influência sobre a frequência de animais soropositivos e a intensidade de resposta imune para todos os agentes, pois ambas aumentaram progressivamente até o animal atingir 36 meses de idade. A partir dos sete meses de idade, foram observados maiores índices de densidade óptica contra todos os agentes analisados, o que pode indicar o início da imunidade ativa. A PCR para amplificação do gene *flgE* de *Borrelia* sp., resultou em uma amostra positiva, cujo sequenciamento revelou 99% de homologia com *B. burgdorferi*. Para *B. bigemina* a técnica de PCR utilizada, com sensibilidade para detectar até 58 parasitos/ $\mu$ L de sangue, revelou apenas um animal positivo. A PCR utilizada nas análises para *B. bovis*, com sensibilidade para detectar até 21 parasitos/ $\mu$ L de sangue, não revelou nenhum positivo em um piloto inicial realizado com amostras de 36 bubalinos altamente soropositivos e 36 negativos no ELISA. A partir deste resultado, não foram testadas as demais amostras de DNA para *B. bovis*. A técnica de PCR para *A. marginale* foi eficiente para animais com até 7,33 parasitos/ $\mu$ L de sangue, revelando uma frequência de 5,42% (16/295) de bubalinos positivos. Para todos os agentes, não houve associação entre os resultados da sorologia e da PCR. O percentual de bubalinos do estado do Rio de Janeiro sororreagentes a *B. burgdorferi* e a existência de um búfalo PCR positivo para este agente sugerem a presença deste espiroquetídeo, ou outro similar antigênica e molecularmente, nesta população animal. *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* estão presentes na população estudada, encontrando-se em baixas parasitemias, em grande parte não detectáveis pelas técnicas de PCR simples utilizadas.

**Palavras chave:** Búfalo, ELISA, PCR

## ABSTRACT

CORRÊA, Fabíola do Nascimento. **An Epidemiological Study of *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* in Buffaloes (*Bubalus bubalis*) of Rio de Janeiro State.** 2011. 99p. Tesis (Doctor in Veterinary Sciences, Animal Health). Veterinary Institute, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

The increasing economic interest on the buffalo breeding activity has stimulated research regarding the health buffalo. This study aimed to determine the frequency of serological and molecular agents *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in buffaloes in Rio de Janeiro state. Seventeen properties were selected, with at least one per micro region with buffalo breeding in Rio de Janeiro state, where the blood was collected from the buffalo by non-probability sampling. Were used 316 serum samples and 295 DNA samples analyzed by ELISA and PCR techniques, respectively. For *B. burgdorferi*, only DNA samples from 12 animals with a higher seropositivity in the ELISA were subjected to PCR. Serologic testing revealed that 59.2% of the animals were positive for *B. burgdorferi*, 51.3% for *B. bovis*, 45.9% for *B. bigemina* and 42.0% for *A. marginale*. There was no association between the sex of the buffalo and the frequencies of animals positive for all agents ( $p>0.05$ ), but females had higher capacity to produce IgG against infection by *B. burgdorferi*, *B. bigemina* and *A. marginale* ( $p<0.05$ ). The age of the animals showed influence on the frequency of seropositive animals and intensity of immune response to all agents, since both increased progressively until the age of 36 months of age. After seven months of age showed higher levels of optical density against all agents tested, which may indicate the onset of active immunity. The PCR for gene amplification *flgE* of *Borrelia* sp. resulted in one positive sample, whose sequencing revealed 99% homology with *B. burgdorferi*. For *B. bigemina*, the PCR technique with sensitivity to detect up to 58 parasites/ $\mu$ L of blood was used and revealed only one positive animal. The PCR used in analysis for *B. bovis*, with sensitivity to detect up to 21 parasites/ $\mu$ L of blood, has not revealed any positive in an initial pilot conducted with samples from 36 buffaloes highly seropositive and 36 negative by ELISA. From this result, not the other DNA samples were tested for *B. bovis*. The PCR for *A. marginale* was effective for animals up to 7.33 parasites/ $\mu$ L blood, revealing a frequency of 5.42% (16/295) of positive buffaloes. For all agents, there was no association between the results of serology and PCR. The percentage of buffaloes in Rio de Janeiro state seropositive to *B. burgdorferi* and the existence of one buffalo PCR positive for this agent suggest the presence this spirochete, or other similar antigenic and molecular level, this animal population. *Babesia bigemina*, *B. bovis* and *A. marginale* are present at low parasitemia in the population studied, most often not detectable by simple PCR used.

**Key Words:** buffalo, ELISA, PCR

## LISTA DE TABELAS

### Página

**Tabela 1** Frequência de anticorpos homólogos do tipo IgG contra *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, detectados por meio do ELISA indireto em soros de búfalos (*Bubalus bubalis*), colhidos entre 06/2008 e 12/2009 e estratificados por mesorregião do estado do Rio de Janeiro. .... **35**

**Tabela 2** Frequência de anticorpos homólogos do tipo IgG contra *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* detectados, por meio do ELISA indireto, em soros de búfalos (*Bubalus bubalis*) do estado do Rio de Janeiro, colhidos entre 06/2008 e 12/2009 e estratificados de acordo com o sexo dos animais. .... **38**

**Tabela 3** Frequência de anticorpos homólogos do tipo IgG contra *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, detectados por meio do ELISA indireto em soros de búfalos (*Bubalus bubalis*) do estado do Rio de Janeiro, colhidos entre 06/2008 e 12/2009 e estratificados de acordo com a faixa etária dos animais. .... **44**

**Tabela 4** Frequência de anticorpos homólogos do tipo IgG contra *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, detectados por meio do ELISA indireto em soros de búfalos (*Bubalus bubalis*), colhidos entre 06/2008 e 12/2009, considerando a infestação por carrapatos, o tratamento carrapaticida, o objetivo da produção e o tipo de criação. .... **51**

## LISTA DE QUADROS

### Página

<b>Quadro 1.</b> Esquema da placa de ELISA utilizada para validação do teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos contra <i>Borrelia burgdorferi</i> em búfalos.....	<b>27</b>
--	-----------

## LISTA DE FIGURAS

### Página

**Figura 1.** Localização dos municípios onde foram colhidas amostras biológicas de bubalinos do estado do Rio de Janeiro. 1-Itaguaí, 2-Casimiro de Abreu, 3-Cachoeiras de Macacu, 4-Rio Claro, 5-Barra do Piraí, 6-Campos Goytacazes, 7-Vassouras, 8-Teresópolis, 9-Rio das Ostras, 10-Itaboraí, 11-Araruama, 12-Macaé, 13-Miracema, 14-Rio de Janeiro e 15-Cantagalo..... **24**

**Figura 2** Produção de IgG anti-*Borrelia burgdorferi* em bezerro búfalo (*Bubalus bubalis*) inoculado com a cepa G39/40 de *B. burgdorferi*. As setas assinalam o momento das inoculações. .... **34**

**Figura 3** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/*cutoff*) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Borrelia burgdorferi* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação ao sexo. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelos testes ANOVA e Tukey com 95% de confiança..... **39**

**Figura 4** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/*cutoff*) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Babesia bovis* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação ao sexo. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras iguais indicam não haver diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelo teste de Kruskal Wallis com 95% de confiança. .... **40**

**Figura 5** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/*cutoff*) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação ao sexo. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelo teste de Kruskal Wallis com 95% de confiança. .... **41**

**Figura 6** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/*cutoff*) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Anaplasma marginale* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação ao sexo. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelo teste de Kruskal Wallis com 95% de confiança. .... **42**

**Figura 7** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/*cutoff*) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Borrelia burgdorferi* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação à faixa etária dos animais. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelo teste de Kruskal Wallis com 95% de confiança..... **45**

**Figura 8** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/*cutoff*) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Babesia bovis* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação à faixa

etária dos animais. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelo teste de Kruskal Wallis com 95% de confiança..... 46

**Figura 9** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/*cutoff*) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação à faixa etária dos animais. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelo teste de Kruskal Wallis com 95% de confiança..... 47

**Figura 10** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/*cutoff*) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Anaplasma marginale* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação à faixa etária dos animais. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelo teste de Kruskal Wallis com 95% de confiança. .... 48

**Figura 11** C+ - Controle positivo *Borrelia garinii*; Buf+ - PCR positiva para o gene *flgE* (L43849) de *Borrelia burgdorferi* em amostra sanguínea bubalina de búfalo do estado do Rio de Janeiro colhida em 24/06/2009..... 52

**Figura 12** Alinhamento da sequência da amostra bubalina positiva na PCR para o gene *Borrelia burgdorferi flagellar hook protein (flgE)* e a sequência do mesmo gene depositada no GenBank (L43849). .... 53

**Figura 13** Diluição de DNA bubalino positivo para *Babesia bigemina* – teste de sensibilidade inicial. PM – padrão de massa molecular 1Kb; C- – controle negativo (sem DNA). .... 54

**Figura 14** Gradiente de temperatura de anelamento da PCR para *Babesia bigemina*. PM – padrão de massa molecular 1Kb; C- – controle negativo (sem DNA); C+ - DNA bubalino positivo diluído a  $10^{-1}$ ..... 54

**Figura 15** Teste de quatro diferentes concentrações de  $MgCl_2$ , usando DNA positivo para *Babesia bigemina* diluído a  $10^{-2}$ ; PM – padrão de massa molecular 1Kb..... 55

**Figura 16** Teste de sete diferentes concentrações de iniciadores GAU7/6 (Linhares et al., 2002), usando DNA bubalino positivo para *Babesia bigemina* diluído a  $10^{-1}$ ; PM – padrão de massa molecular 1Kb..... 55

**Figura 17** Diluição de DNA bubalino positivo para *Babesia bigemina* – teste de sensibilidade final. PM – padrão de massa molecular 100pb; C- – controle negativo (sem DNA). .... 56

**Figura 18** Diluição de DNA bovino positivo para *Babesia bovis* – teste de sensibilidade inicial. PM – padrão de massa molecular 1Kb; C- – controle negativo (sem DNA). .... 58

**Figura 19** Gradiente de temperatura de anelamento da PCR para *Babesia bovis*. PM – padrão de massa molecular 1Kb; C- – controle negativo (sem DNA); C+ - DNA bovino positivo diluído a  $10^{-1}$ ..... 58

**Figura 20** Teste de quatro diferentes concentrações de  $MgCl_2$ , usando DNA positivo para *Babesia bovis* diluído a  $10^{-1}$ ; PM – padrão de massa molecular 1Kb. .... 59

<b>Figura 21</b> Teste de seis diferentes concentrações de iniciadores GAU9/10 (Linhares et al., 2002), usando DNA bovino positivo para <i>Babesia bovis</i> diluído a $10^{-1}$ ; PM – padrão de massa molecular 1Kb. ....	<b>59</b>
<b>Figura 22</b> Diluição de DNA bubalino positivo para <i>Babesia bovis</i> (541pb) – teste de sensibilidade final. PM – padrão de massa molecular 1Kb; C- – controle negativo (sem DNA).. ....	<b>60</b>
<b>Figura 23</b> Diluição de DNA positivo para <i>Anaplasma marginale</i> – teste de sensibilidade inicial. PM – padrão de massa molecular 100pb; C- – controle negativo (sem DNA). ....	<b>61</b>
<b>Figura 24</b> Gradiente de temperatura de anelamento da PCR para <i>Anaplasma marginale</i> . PM – padrão de massa molecular 100pb; C- – controle negativo (sem DNA); C+ - controle positivo diluído a $10^{-2}$ . ....	<b>62</b>
<b>Figura 25</b> Teste de quatro diferentes concentrações de $MgCl_2$ , usando DNA positivo para <i>Anaplasma marginale</i> diluído a $10^{-2}$ ; PM – padrão de massa molecular 100pb. ....	<b>62</b>
<b>Figura 26</b> Teste de cinco diferentes concentrações de iniciadores, usando DNA positivo para <i>Anaplasma marginale</i> diluído a $10^{-2}$ ; PM – padrão de massa molecular 100pb. ....	<b>63</b>
<b>Figura 27</b> Diluição de DNA positivo para <i>Anaplasma marginale</i> – teste de sensibilidade final. PM – padrão de massa molecular 100pb; C- – controle negativo (sem DNA). ....	<b>63</b>
<b>Figura 28</b> Diluição de DNA positivo para <i>A. marginale</i> (semi nPCR) – teste de sensibilidade. (1) Contaminação da diluição $10^{-7}$ , (2) bandas inespecíficas e (3) banda da primeira reação (PCR). PM – padrão de massa molecular 100pb; C- – controle negativo (sem DNA). ....	<b>65</b>

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 A Bubalinocultura no Brasil.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Carrapatos em Bubalinos .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3 <i>Borrelia burgdorferi</i> (Johnson et al., 1984) .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3.1 Aplicações do teste ELISA e da PCR no diagnóstico de <i>B. burgdorferi</i> .....</b>	<b>6</b>
<b>2.4 <i>Babesia bigemina</i> (Smith; Kilbourne, 1893) e <i>B. bovis</i> (Babés, 1888) .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.1 Aplicações do teste ELISA e da PCR no diagnóstico de <i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>2.5 <i>Anaplasma marginale</i> (Theiler, 1910) .....</b>	<b>16</b>
<b>2.5.1 Aplicações do teste ELISA e da PCR no diagnóstico de <i>A. marginale</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Estudo Sorológico de <i>B. burgdorferi</i> e Agentes da TPB em Búfalos do Estado do Rio de Janeiro, por Meio do ELISA Indireto. ....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.1 Obtenção das amostras .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.2 Obtenção do antígeno para <i>B. burgdorferi</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.3 Produção do soro hiperimune para <i>B. burgdorferi</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.4 Obtenção dos antígenos e controles positivos para os agentes da TPB .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.5 Obtenção de controles negativos para <i>B. burgdorferi</i> e agentes da TPB.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1.6 Validação do teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-<i>B. burgdorferi</i> em búfalos.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1.7 ELISA indireto para pesquisa de anticorpos do tipo IgG anti-<i>B. burgdorferi</i> em búfalos.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1.8 ELISA indireto para pesquisa de anticorpos do tipo IgG contra agentes da TPB em búfalos.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Diagnóstico Molecular de <i>B. burgdorferi</i> e Agentes da TPB em Búfalos do Estado do Rio de Janeiro, por Meio da PCR. ....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.1 Obtenção das amostras de DNA.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.2 Obtenção dos controles positivos .....</b>	<b>29</b>



3.2.3 PCR para <i>B. burgdorferi</i> .....	29
3.2.4 Adaptação da PCR para <i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i> .....	30
3.2.5 Adaptação da PCR para <i>A. marginale</i> .....	31
3.2.6 PCR para <i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i> .....	31
3.2.7 PCR para <i>A. marginale</i> .....	32
3.2.8 Determinação da sensibilidade das reações de PCR para agentes da TPB.....	32
3.3 Sequenciamento .....	33
3.4 Análise Estatística.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
4.1 Produção do Soro Hiperimune para <i>B. burgdorferi</i> .....	34
4.2 Modificações do Teste ELISA Indireto para <i>B. burgdorferi</i> .....	35
4.3 Frequência de Anticorpos Homólogos do tipo IgG Contra <i>B. burgdorferi</i> , <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>A. marginale</i> . .....	35
4.4 Diagnóstico Molecular de <i>B. burgdorferi</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>B. bovis</i> e <i>A. marginale</i> , por Meio da Técnica de PCR.....	52
4.4.1 <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	52
4.4.2 <i>Babesia bigemina</i> .....	53
4.4.3 <i>Babesia bovis</i> .....	57
4.4.4 <i>Anaplasma marginale</i> .....	61
5 CONCLUSÕES.....	66
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
ANEXOS .....	95

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos a bubalinocultura tem se expandido no Brasil, onde deixou de ser utilizada somente para ocupação de terras impróprias para criação de gado bovino e passou a ser opção de criação pecuária. Com isso, a preocupação com a sanidade do rebanho bubalino tem aumentado consideravelmente, pois muitos aspectos das doenças em búfalos não são conhecidos.

A rusticidade anatômica e fisiológica dos bubalinos confere certa resistência e permite que muitas doenças não ocorram ou cursem de forma subclínica. No entanto, os búfalos possuem hábito gregário, propício à disseminação de vetores de agentes etiológicos que associados a práticas de manejo inadequadas, podem favorecer a evidência de sintomas. Desta forma, estudos sobre as enfermidades que acometem bubalinos são essenciais para determinar medidas sanitárias específicas.

Assim como os bovinos, os búfalos são normalmente parasitados por carrapatos, embora geralmente apresentem infestações menos intensas. O carrapato *Rhipicephalus microplus* tem sido uma das espécies mais encontradas parasitando bubalinos e é o principal vetor de agentes etiológicos de doenças como a borreliose bovina, causada por *Borrelia theileri*, além das babesioses e da anaplasmose em ruminantes.

A borreliose em ruminantes é causada por *B. theileri*, mas *Borrelia burgdorferi*, agente etiológico da doença de Lyme no hemisfério norte, também infecta estes animais. A doença de Lyme tem grande importância em saúde pública por ser uma antropozoonose infecciosa bastante disseminada. No Brasil, esta enfermidade é conhecida como borreliose de Lyme símile, pois apresenta algumas diferenças clínicas em humanos e, principalmente, porque o agente etiológico ainda não está totalmente elucidado. Porém, estudos recentes têm apontado a possibilidade do agente etiológico da borreliose brasileira ser geneticamente homólogo a *B. burgdorferi* (MADUREIRA, 2007; MANTOVANI, 2010).

O primeiro relato de *Borrelia* sp. em búfalos foi realizado por Scofield et al. (2005), no estado do Pará, ao observar morfometricamente espiroquetídeos em uma búfala com suspeita clínica de Leucose Enzoótica Bovina que em seguida foi a óbito. Seguidamente, Corrêa (2007) observou 83,9% de bubalinos sororreagentes a *B. burgdorferi* na mesma região.

As babesioses bovinas, causadas por *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, e a anaplasmose, causada por *Anaplasma marginale*, são doenças de grande importância econômica para a bovinocultura do Brasil. A infecção concomitante por estes três agentes etiológicos é de ocorrência comum em bovinos e caracteriza a enfermidade conhecida como Tristeza Parasitária Bovina (TPB), responsável por perdas significativas com a mortalidade de animais, diminuição da produção e com os gastos na aplicação de medidas para seu controle.

Em todo o mundo os bubalinos são considerados resistentes ao desenvolvimento de doenças causadas pelos agentes da TPB, podendo atuar como reservatório destes agentes. No entanto, já foi observado que bezerros podem desenvolver sintomas quando se encontram em condições adversas.

O estado do Rio de Janeiro conta atualmente com 5.401 bubalinos (IBGE-PPM, 2008) e não existem trabalhos sobre os agentes da TPB e da borreliose nessa população. O presente estudo teve como objetivos verificar a frequência sorológica, por meio do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto, e parasitológica, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), dos agentes *B. burgdorferi*, *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* em búfalos do estado do Rio de Janeiro.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A Bubalinocultura no Brasil

O búfalo doméstico está classificado na subfamília Bovinae, gênero *Bubalus*, espécie *Bubalus bubalis* (Linneau, 1758), sendo divididos em dois grupos principais: *Bubalus bubalis* var. *bubalis*, também conhecidos como "River Buffalo", búfalo-do-rio ou búfalo aquático; e *Bubalus bubalis* var. *kerebau* ou Carabao, composto por apenas uma raça, popularmente conhecida como "Swamp Buffalo" ou búfalo-do-pântano (ABCB, 2010).

De origem asiática, os bubalinos chegaram ao Brasil por volta de 1890, na Ilha de Marajó, estado do Pará, onde se adaptaram e se multiplicaram com rapidez. Atualmente são encontrados em todos os estados do território nacional, constituindo o maior rebanho do ocidente (BERNARDES, 2007).

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), por meio da Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) de 2008, apontou um rebanho nacional de 1.146.798 cabeças de búfalos. Porém, segundo a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, o rebanho bubalino hoje no país conta com cerca de três milhões de animais pertencentes às raças Mediterrâneo, Murrah, Jafarabadi e Carabao. Dentre as regiões do Brasil, a norte apresenta a maior população de búfalos, com mais de 720.000 cabeças. Já o nordeste é o segundo em número de cabeças de gado bubalino, seguido pelas regiões sul, sudeste e centro-oeste, nesta ordem (IBGE-PPM, 2008).

Animal de porte avantajado e pelagem preta, os bubalinos são rústicos, longevos e muito dóceis. São animais de alta eficiência reprodutiva, com capacidade de ocupar 100% das áreas territoriais disponíveis e de transformar gramíneas de baixa qualidade em derivados de alto valor agregado (BERNARDES, 2007; ROSA et al., 2007). Desta forma, o búfalo tem garantido espaço como opção pecuária para a produção de carne, leite e couro para consumo humano, além de serem aproveitados como força de trabalho no campo (BERNARDES, 2007).

O Brasil se encontra em posição bastante privilegiada com relação à bubalinocultura visto que dispõe de exemplares com produtividade leiteira comparável aos melhores espécimes. No segmento de corte, o país também já dispõe de animais com performances bem mais expressivas que as existentes nos países de origem, onde a atividade é relativamente pouco explorada (BERNARDES, 2007).

Os búfalos são conhecidos por apresentarem grande resistência ao desenvolvimento de doenças comuns aos bovinos. No entanto, o hábito de permanecerem aglomerados por longos períodos favorece as infecções parasitárias, que somadas ao manejo nutricional precário e confinamento com alta taxa de lotação, podem levar bubalinos a apresentarem sinais clínicos de inúmeras doenças (COCKRILL, 1981; LAÚ, 1999).

De uma forma geral, muitos aspectos das doenças de búfalos não são conhecidos, e comumente, os procedimentos adotados para diagnóstico, tratamento e controle das enfermidades em bubalinos são baseados nas práticas seguidas para bovinos (MATHIAS et al., 1998). A possibilidade do aumento da exploração comercial de búfalos e o fato destes serem portadores de muitos parasitas de bovinos têm estimulado interesse científico sobre a sanidade bubalina (CHARLES; JOHNSON, 1972; MOHAN, 1968 *apud* CALLOW, 1976).

## 2.2 Carrapatos em Bubalinos

Bubalinos são popularmente conhecidos por serem resistentes às infestações por carrapatos. No entanto, algumas espécies de carrapatos já foram descritas parasitando búfalos, normalmente em menor intensidade do que em bovinos (NITHIKATHKUL et al., 2002).

Miranpuri (1988), em trabalho realizado na Índia, observou que espécies de carrapatos coletadas de búfalos são semelhantes às encontradas em bovinos, o que permite a transmissão de doenças entre essas espécies hospedeiras. Neste trabalho, foram encontradas 19 espécies diferentes de carrapatos parasitando uma população de 618 bubalinos, estando entre elas *Amblyomma testudinarum*, *Nosomma monstrosus*, cinco espécies do gênero *Hyalomma*, nove do gênero *Haemaphysalis* e três do gênero *Rhipicephalus*, sendo a espécie *R. microplus* a mais prevalente entre todos os carrapatos.

No Brasil, são encontrados poucos relatos sobre o parasitismo por carrapatos em búfalos. Rocha et al. (1969) verificou a presença de infestação natural por *R. microplus* e *Dermacentor nitens* em bubalinos de São Paulo e Minas Gerais, parasitando principalmente nas faces internas das coxas, nas axilas, no períneo, no úbere e em geral nas regiões de pele mais fina e de pelos mais curtos.

No Mato Grosso do Sul, coletas semanais de *R. microplus* em bubalinos revelaram que apenas 4,03% dos carrapatos atingia o estágio adulto, o que levou a considerar os búfalos resistentes a infestação por esta espécie (STARKE et al., 1985). Posteriormente, foram comparados os graus de infestação natural por *R. microplus* em bovinos da raça Guzerá e em búfalos mestiços da mesma faixa etária, mantidos juntos por um ano. Assim, verificou-se que os bovinos apresentaram-se com seis vezes mais carrapatos adultos do que os búfalos, demonstrando maior adaptabilidade destes ixodídeos aos bovinos (STARKE et al., 1994). Em ambos os trabalhos, foi observado maior grau de infestação por carrapatos durante o período seco do ano.

## 2.3 *Borrelia burgdorferi* (Johnson et al., 1984)

O gênero *Borrelia* (Swellengrebel, 1907) é constituído por bactérias Gram negativas, microaerófilas, móveis, classificadas na ordem Spirochaetales, família Spirochaetaceae. Todas as espécies descritas possuem flagelos e formato helicoidal que pode variar de 3 a 10 espiras, medem de 4 a 30µm de comprimento e se reproduzem por fissão binária transversal (KRIEG; HOLT, 1984; BARBOUR; HAYES, 1986; AUSTIN, 1993; PFISTER et al., 1994), podendo ser distinguidas morfometricamente dos demais gêneros de espiroquetídeos por serem maiores, com maior número de flagelos periplasmáticos (15 a 20) e menor número de espiras (AUSTIN, 1993; PFISTER et al., 1994).

Algumas espécies de espiroquetas do gênero *Borrelia* são responsáveis pela enfermidade denominada borreliose de Lyme ou doença de Lyme, considerada uma antroponose infecciosa, sistêmica e cosmopolita. A doença foi primeiramente observada por Buchwald (1883) na Alemanha e foi descrita como uma atrofia difusa de pele com caráter idiopático, que em 1902, recebeu o nome de acrodermatite atrófica crônica, por Herxheimer; Hartmann. Somente em 1975, após ser reportada nos Estados Unidos (EUA), em Connecticut, e mais tarde em Old Lyme, com sintomas semelhantes à artrite reumatóide juvenil, foi caracterizada como uma desordem multissistêmica denominada artrite de Lyme ou doença de Lyme (STEERE et al., 1977a; b).

Contudo, o reconhecimento do agente causal da doença de Lyme e seu isolamento só foram realizados em 1981, quando Burgdorfer et al. (1982) encontraram estruturas espiraladas

móveis no trato digestivo de carrapatos que posteriormente, receberam de Johnson et al. (1984), o nome de *Borrelia burgdorferi*. Atualmente, sabe-se que a borreliose de Lyme clássica, de ocorrência no hemisfério norte, tem como agentes etiológicos *B. burgdorferi* stricto sensu, *B. afzelii* e *B. garinii* (STEERE, 2001).

Outras espécies de *Borrelia* spp. também já foram identificadas causando enfermidade semelhante à borreliose de Lyme clássica, porém, apresentando pequenas variações genéticas, como *B. japonica* (KAWABATA et al., 1993), *B. lusitaniae* (LE FLECHE et al., 1997), *B. tanukii* e *B. turdi* (FUKUNAGA, et al., 1996), *B. valaisiana* (WANG et al., 1997), *B. sinica* (MASUZAWA et al., 2001) e *B. spielmanii* (RICHTER et al., 2006), todas na Eurásia; *B. andersoni* (MARCONI et al., 1995), *B. californiensis* (POSTIC et a., 2007), *B. carolinensis* (RUDENKO et al., 2009a), *B. americana* (RUDENKO et al., 2009b), associadas somente aos EUA; e *B. bissetii* (POSTIC et al., 1998) presente tanto no novo quanto no velho mundo.

Artrópodes hematófagos, primordialmente carrapatos são os transmissores de *Borrelia* spp. (BUTLER; DENMARK, 1990), sendo as espécies *Ixodes scapularis* e *I. pacificus*, nos EUA e, *I. ricinus* e *I. persulcatus* na Europa e Ásia, os vetores da borreliose de Lyme clássica (EISEN; LANE, 2002). No entanto, existem relatos de transmissão de *B. burgdorferi* por tabanídeos, culicídeos e sifonápteros (MAGNARELLI; ANDERSON, 1988; DOBY et al., 1991).

O contato com urina de animais infectados, transfusão sanguínea e transplante de tecido também podem causar infecção (BARBOUR; HAYES, 1986; BURGESS et al., 1986; HYDE et al., 1989; DORWARD et al., 1991) e, além destes, transmissão congênita já foi reportada em bovinos e cães (GUSTAFSON et al., 1993; BURGESS, 1988; BUSHMICH, 1994).

Os reservatórios das espiroquetas que causam a doença de Lyme são os animais silvestres como os cervídeos, roedores, aves (STEERE et al., 1983; GILL et al., 1994; BOSLER, 1993). Por sua vez, as aves migratórias são apontadas como dispersoras de larvas e ninfas de carrapatos infectados a longas distâncias (ANDERSON, 1988; COMSTEDT et al., 2006).

A infecção do carrapato vetor ocorre pela ingestão de sangue contaminado com *Borrelia* spp., ocorrendo transmissão transovariana e transtadial (SMITH et al., 1978; HOOGSTRAAL, 1985; LANE; BURGDORFER, 1987). No entanto, a transmissão deste agente por carrapatos ixodídeos ocorre principalmente pela fase de ninfa, que, por isso, tem maior importância epidemiológica na transmissão, manutenção e dispersão da espiroqueta, apesar de todos os ínstares possuírem habilidade para transmiti-la. Estudos demonstraram que para esses vetores é necessário um tempo de fixação no hospedeiro superior a 48 horas para que ocorra a transmissão (BENACH et al., 1987; LANE; BURGDORFER, 1987; LANE; MANWEILER, 1988). Porém, mais recentemente, em um estudo envolvendo 3.126 pessoas, Mladenović et al. (2010) concluíram que houve um alto risco absoluto de ocorrer doença de Lyme, quanto maior o tempo de exposição após 24 horas de fixação do carrapato.

A primeira observação de *Borrelia* spp. no Brasil ocorreu em 1988, quando Filgueira et al. analisaram um paciente com eritema crônico migratório, cuja biópsia revelou organismos com morfologia compatível com este agente. Porém, a primeira publicação alertando para a possibilidade da existência de borreliose de Lyme no Brasil foi realizada por Yoshinari et al. (1989) devido à presença de possíveis vetores e da espiroqueta no país; e em 1992, no estado de São Paulo, foram descritas as primeiras observações da doença em humanos, com algumas diferenças em relação à doença de Lyme norte americana (YOSHINARI et al., 1993a; b).

Constituem parte do conjunto de diferenças entre a enfermidade encontrada no Brasil e a doença de Lyme clássica, o fato de o agente etiológico brasileiro ser incultivável em meio BSK e a ausência de carrapatos do complexo *Ixodes ricinus* (conhecidos vetores da doença de

Lyme clássica) em áreas de risco (BARROS-BATTESTI et al., 2000, ABEL et al., 2000), além de outros relacionados à sintomatologia em humanos (MANTOVANI, 2010).

As diferenças encontradas entre ambas as enfermidades conduziram a diferentes nomenclaturas para doença no Brasil, a qual já foi chamada de Doença de Lyme-símile, Síndrome infecto-reacional Lyme símile (SIRLS) e Doença de Lyme símile Brasileira. Recentemente, recebeu nova denominação - Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY), definida como uma enfermidade de origem infecciosa, transmitida por carrapatos dos gêneros *Amblyomma* e/ou *Rhipicephalus*, causada por espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* lato sensu de morfologia atípica e incultivável, determinando complicações sistêmicas e recorrentes, incluindo desordens imunológicas, ao longo da prolongada evolução clínica (MANTOVANI et al., 2007; YOSHINARI et al., 2010).

Enfermidade com manifestações clínicas similares à borreliose de Lyme também é registrada na Austrália e em outros países da América do sul e África. No entanto, a etiologia não é totalmente esclarecida, visto que, como no Brasil, ainda não se conseguiu o isolamento do agente (YOSHINARI et al., 2000).

Espiroquetas morfológicamente similares às do gênero *Borrelia* foram observadas em *Amblyomma cajennense*, *A. aureolatum*, *Ixodes* sp., *I. didelphidis*, *I. loricatus*, no Brasil (BARROS-BATTESTI, 1998, 2000; ABEL et al., 2000). Além destes, o carrapato *R. microplus* é um suspeito transmissor, devido à observação de coexistência de anticorpos para *B. burgdorferi* e *Babesia bovis* em humanos com SBY (YOSHINARI, et al., 2003) e devido à observação de espiroquetas em cultivo de células de *R. microplus* que foram geneticamente semelhantes a *B. burgdorferi* para um determinado gene (MADUREIRA, 2007).

Animais silvestres, em especial os pequenos roedores e marsupiais, são considerados os maiores reservatórios brasileiros de espiroquetas, as quais não se desenvolvem em meios de culturas habituais, a exemplo do que ocorre com espiroquetídeos observados em carrapatos e doentes com borreliose de Lyme símile brasileira (ABEL et al., 2000; BARROS-BATTESTI et al., 2000; YOSHINARI et al., 2010).

Burgess et al. (1987) observaram artrite e doença sistêmica em mamíferos domésticos, com detecção da presença de *B. burgdorferi*, em áreas onde ocorreram casos humanos de borreliose. Posteriormente, foi constatado que os animais domésticos, especificamente equinos, bovinos e caninos, contraem a infecção e são potenciais agentes transportadores de carrapatos para o ambiente peridomiciliar (BOSLER, 1993; MATHER et al., 1994; ISHIKAWA, 1996; SOARES et al., 1999).

Em bovinos, a infecção por *B. burgdorferi* é frequentemente assintomática. Quando há o desenvolvimento de sinais clínicos, são principalmente observados: a manqueira, o edema das articulações e, menos frequentemente, a laminite, além de febre, perda de peso, depressão da produção leiteira e aborto (POST et al., 1986; BURGESS, 1988; PARKER; WHITE, 1992; BUSHMICH, 1994; BENXIU; COLLINS, 1994). Devido ao fato de bovinos servirem como hospedeiros para carrapatos *Ixodes* spp. adultos, principais vetores de *B. burgdorferi* nos EUA, Europa e Ásia, além de outras espécies de ixodídeos (BUSHMICH, 1994; YOSHINARI et al., 1997), pode-se cogitar um papel relevante desses animais no ciclo zoonótico da borreliose de Lyme.

No entanto, espécie de *Borrelia* mais comumente reportada em bovinos é *Borrelia theileri* (Laveran, 1903), que também infecta equinos e outros ruminantes domésticos e silvestres (NEITZ, 1935; IRVIN et al., 1973). Embora a infecção por *B. theileri* seja assintomática na maioria das vezes, esta espiroqueta permanece importante por ser bastante difundida geograficamente e confundível com *B. burgdorferi*; com *B. coriaceae*, provável agente do aborto epizootico bovino; e com espécies de *Borrelia* ainda não isoladas implicadas em doença semelhante à borreliose de Lyme (SMITH et al., 1978; SMITH; ROGERS, 1998). A distinção entre estas três espécies de espiroquetas que acometem ruminantes é importante

uma vez que a distribuição geográfica dos vetores e hospedeiros vertebrados são coincidentes (SMITH; ROGERS, 1998).

*Borrelia theileri* geralmente ocorre associada à babesiose e/ou anaplasmoses agravando o quadro hematológico do animal, especialmente em animais esplenectomizados (SCHWETZ, 1935 *apud* MATTON; MELCKEBEKE, 1990; SMITH et al., 1985; UILENBERG, 1986), sendo a única espécie reconhecida e identificada em bovinos e equinos no Brasil (LOPES, 1976, MADUREIRA, 2007). Esta espécie de espiroqueta tem sido reportada quase exclusivamente em latitudes tropicais, correlacionada com a distribuição de carrapatos vetores, como espécies dos gêneros *Haemaphysalis* sp., *Ixodes* sp. e *Rhipicephalus* spp., entre elas, *R. microplus* (CALLOW, 1967; MARTINS et al., 1996; VIVAS et al., 1996; SHARMA et al., 2000).

Em 2005, Scofield et al., registrou a primeira ocorrência de *Borrelia* sp. em *B. bubalis* no Brasil. Foram observadas formas típicas deste espiroquetídeo em esfregaço sanguíneo de uma búfala do estado do Pará com suspeita clínica de Leucose Enzoótica Bovina, que em seguida foi a óbito. Porém, devido ao polimorfismo encontrado entre os organismos observados ao exame hemoscópico, apenas a identificação do gênero foi possível. Na mesma região, Corrêa (2007) observou a presença de 83,9% de bubalinos sorologicamente positivos para *B. burgdorferi*, sugerindo ocorrência de reação cruzada entre a cepa G39/40 de *B. burgdorferi*, usada como antígeno, e a espécie de *Borrelia* spp. que infecta búfalos no estado do Pará.

### 2.3.1 Aplicações do teste ELISA e da PCR no diagnóstico de *B. burgdorferi*

A confirmação diagnóstica da doença de Lyme é basicamente sorológica, já que a cultura é um procedimento demorado e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ainda é pouco empregada, pois só identifica casos em que as espiroquetas estão circulantes ou depositadas em tecidos (YOSHINARI et al., 2010).

Cada método de detecção de anticorpos tem vantagens e desvantagens quanto à sensibilidade, especificidade, facilidade de padronização e custo (MAGNARELLI et al., 2004). Em todas as regiões onde se tem relatado a borreliose de Lyme, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto tem sido o método mais utilizado para diagnóstico e levantamentos epidemiológicos, representando a principal ferramenta imunológica, devido às suas sensibilidade e especificidade elevadas (MAGNARELLI et al., 1987; SOARES et al., 2000a). Porém, outras técnicas sorológicas, como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o western blotting, podem ser utilizadas para o diagnóstico de borrelioses (BENNETT, 1995; MAGNARELLI et al., 2004).

A RIFI é uma prova subjetiva que pode ser usada para triagem ou ocasionalmente, quando dados clínicos e epidemiológicos fortalecem o diagnóstico (MAGNARELLI et al., 1984), porém o ELISA indireto a equivale quanto à especificidade e a supera quanto à sensibilidade e operacionalidade (WELLS et al., 1993).

O western blotting é uma técnica mais demorada e com maior custo para se realizar. É recomendada para definição do resultado junto ao ELISA por ser mais específico, mas por outro lado pode incorrer em resultados inclusivos (DRESSLER et al., 1993; ENGSTROM et al., 1995; SOOD et al., 1995; MAGNARELLI et al., 2004).

Na pesquisa de anticorpos contra *Borrelia* spp. por meio do ELISA indireto podem ser utilizados diversos tipos de antígeno, como o extrato de célula total sonicada (GORDILLO et al., 1999), proteínas recombinantes (WILSKE et al., 1999; MAGNARELLI et al., 2010) e peptídeos (CRAFT et al., 1986). Espiroquetas íntegras também podem ser utilizadas, porém têm demonstrado resultado inferior (BENNETT, 1995). Segundo Soares et al. (2000a) o

ensaio deve ser padronizado para cada laboratório com padrões de controle adequados, com o título mínimo e linha de corte (*cutoff*) seguros. Em estudos com bovinos, extrato total de *B. burgdorferi* sonicado ainda é o antígeno mais comumente utilizados nos estudos sorológicos (BURGESS et al., 1987).

Recentemente, diversas proteínas de superfície de *B. burgdorferi* têm sido avaliadas para atuarem como antígeno em testes sorológicos, porém esta espiroqueta produz distintas proteínas externa de membrana durante a infecção de mamíferos e exibem diferentes formas de escapar da resposta imune do hospedeiro vertebrado (STEVENSON et al., 2002). Hadani et al. (1985) relatam que as espécies de *Borrelia* spp. sofrem variações antigênicas que podem dificultar a identificação sorológica em nível de espécie e Liang et al. (2004) também demonstraram que *B. burgdorferi* muda a expressão de sua superfície antigênica em resposta ao ataque imune. Entretanto, pouco se sabe sobre como este microrganismo extracelular sobrevive ao hostil ambiente imune durante a infecção em mamíferos.

Na membrana externa existem várias proteínas de superfície, incluindo OspA, OspB, OspC, OspD, OspE, OspF, e a lipoproteína p27, que induzem resposta imune no hospedeiro (JWANG et al., 1995). O uso de proteínas recombinantes altamente específicas como as de peso molecular de 31 kDa (OspA), 34 kDa (OspB) e 110kDa em teste ELISA tem melhorado a sensibilidade e especificidade da detecção de anticorpos contra *B. burgdorferi* em humanos, cães, equinos e bovinos (GREENE et al., 1988; CAPUTA et al., 1991; MAGNARELLI et al., 1997; 2004), porém há pouca informação disponível sobre o desempenho e adequabilidade do ELISA com antígeno recombinante (MAGNARELLI et al., 2004).

Magnarelli et al. (2004) compararam os resultados do teste ELISA usando antígenos recombinantes e célula total de *B. burgdorferi*. Foi observado que o uso de células totais como antígeno aumentou a sensibilidade do teste, embora com menor especificidade, sendo mais prático para iniciar a pesquisa em grande número de soros bovino. Neste estudo, na maioria das vezes, os soros bovinos testados reagiram fracamente a apenas um dos 10 antígenos recombinantes avaliados e, com exceção da proteína p39, todos tiveram ao menos um animal positivo. Desta maneira, foi evidenciada a importância de mais estudos para se conhecer quais proteínas são frequentemente expressadas e determinam um padrão de resposta em bovinos.

A proteína de superfície VlsE tem sido importante no diagnóstico em humanos, identificando anticorpos produzidos durante infecção tardia ou recente por *B. burgdorferi* (BACON et al., 2003). Recentemente, Magnarelli et al. (2010), em um estudo com cervídeos silvestres, relataram uma alta concordância entre os resultados de um ELISA indireto usando antígeno total (cepa 2591; 63%) e outro usando a proteína vlsE como antígeno recombinante (59%). Além disso, observaram alta reprodutibilidade e manutenção do nível de titulação quando repetido o teste em diferentes dias. Assim, foi sugerida a substituição do western blotting como teste confirmatório para pesquisa de anticorpos anti *B. burgdorferi*.

Pesquisas soropidemiológicas em animais têm demonstrado não haver relação entre anticorpos contra *B. burgdorferi* e *Leptospira* sp. que leve a reação cruzada e, nos casos em que foi registrada, não mostrou ser significativa (MAGNARELLI et al., 1984; MAY, 1990; JOPPERT, 1995; BENNETT, 1995; ISHIKAWA, 1996; SOARES et al., 1999). Magnarelli et al. (1987) observaram que de 17 soros positivos para *Leptospira* nenhum reagiu com *B. burgdorferi*. Da mesma forma, Soares et al. (1999) avaliaram 15 amostras de soros para *B. burgdorferi* e 24 variantes sorológicas de *Leptospira* sp. em cães e constataram 7 positivas para a primeira e nenhuma positiva para *Leptospira* sp.

Em humanos e animais, reações cruzadas já foram observadas entre *B. burgdorferi* e *Treponema* sp. Em 15 soros positivos para *Treponema* sp. três reagiram ao antígeno de *B. burgdorferi*, e em 18 pacientes com sinais de doenças causadas por *Treponema* sp., sem histórico de borreliose de Lyme, 25% apresentaram reação positiva para *B. burgdorferi*



(MAGNARELLI et al., 1987; 1990). Posteriormente, Magnarelli e Anderson (1998) reportaram que reações cruzadas entre estes agentes não são significativas.

Segundo Rogers et al. (1999), reações cruzadas devem ser levadas em conta quando for feito sorodiagnóstico de borreliose de Lyme ou aborto epizootico bovino em estudos epidemiológicos envolvendo bovinos, pois observaram que bezerros infetados com *B. theileri* produzem anticorpos que reagem contra antígenos totais de *B. burgdorferi* e *B. coriaceae*, quando usado o teste de IFI, porém com títulos de anticorpos mais baixos do que quando usado *B. theileri* como antígeno. No entanto, reações falso-positivas não foram encontradas quando usado teste ELISA, que consistia em um kit comercial para infecção por *B. burgdorferi* em cães.

Embora existam diferentes formas para a detecção direta de agentes etiológicos, as técnicas moleculares em muitos casos aumentam bastante a sensibilidade e a especificidade do processo de detecção, pois a subjetividade inerente à interpretação morfológica e a dados biológicos é reduzida. Além disso, métodos baseados na identificação molecular que focam no genoma do parasito são geralmente não limitados a um estágio de desenvolvimento particular. Por outro lado, como em qualquer tecnologia que apresente alto nível de sensibilidade como pode ser alcançado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a contaminação cruzada e sinais falso-positivos tornam-se a maior preocupação, especialmente quando esta técnica é usada como método de definição de um diagnóstico. Outro problema da PCR é que enzimas utilizadas na reação podem ser sensíveis a inibidores presentes nos substratos onde se encontram o DNA alvo. Desta forma, cuidados devem ser tomados para tentar anular efeitos inibitórios (ZARLENGA et al., 2001).

A técnica de PCR tem sido empregada para detecção de *Borrelia* sp. em fluidos e tecidos de humanos, de animais e em fragmentos de carrapatos (MOTER et al., 1994; ZBINDEN et al., 1994; RUDENKO et al., 2009a; ZHAN et al., 2009). Porém, seu uso como método diagnóstico não é muito comum, sendo principalmente usada na caracterização genética e estudo de genes que codificam proteínas específicas (JWANG et al., 1995; ALEKSHUN et al., 1997; FRASER et al., 1997).

Alguns marcadores genéticos, como os genes *16SrRNA*, *fla* (RICH et al., 2001) e *rpoB* (ALEKSHUN et al., 1997) têm sido usados com sucesso na identificação de *Borrelia* spp. por terem regiões bem conservadas, úteis na diferenciação de espécies deste gênero. Com base nestes genes, as espécies de *Borrelia* foram divididas filogeneticamente em três grandes grupos, um relacionado às espécies que em conjunto são conhecidas como *B. burgdorferi* lato sensu e outros dois relacionados com a febre recorrente (FUKUNAGA et al., 1996).

No Brasil, o uso da PCR para detecção de *Borrelia* spp. é muito recente e apenas dois estudos foram realizados. Madureira (2007), ao analisar genotipicamente espiroquetas obtidas de equino, do carrapato *R. microplus* e de humano com borreliose de Lyme símile, conseguiu amplificação utilizando iniciadores para os genes *16SrRNA*, *fla* e *rpoB*. Neste estudo, a amplificação dos genes *16SrRNA* e *fla* da espiroqueta isolada de equinos apresentaram homologia de 98% e 99% com *B. theileri*, respectivamente. Para o gene *rpoB* foi observado 92% de homologia *B. hermsii* e não foram encontrados registros de sequências do gene *rpoB* de *B. theileri*. As sequências obtidas da espiroqueta oriunda de carrapato apresentaram resultados variados, permitindo apenas caracterizá-la como pertencente ao gênero *Borrelia*, porém, vale ressaltar que para o gene *16SrRNA* a homologia foi de 100% com *B. burgdorferi*. O mesmo foi observado com o isolado humano, cuja sequência amplificada apresentou 99% de similaridade com o gene *16SrRNA* de *B. burgdorferi*.

Muitas tentativas de amplificação de genes que codificam proteínas de superfície e flagelares de *B. burgdorferi* já foram realizadas sem sucesso, possivelmente devido à espécie de *Borrelia* spp. encontrada no país apresentar-se na forma bacteróide sem flagelos

(MANTOVANI, 2010). Esta forma ocorre quando as espiroquetas são desprovidas do gene responsável pela formação do filamento flagelar (*flaB*) (MOTALEB et al., 2000).

Devido a essa morfologia atípica, Mantovani et al. (2007) pensaram que a SBY seria uma enfermidade, causada por um conjunto de microorganismos latentes, incluindo uma espiroqueta não definida, *Mycoplasma* spp. e *Chlamydia* spp., pois formas semelhantes a estes microorganismos foram observadas por microscopia eletrônica em material biológico de pacientes com SBY.

No entanto, Mantovani (2010) realizou teste sorológico e PCR em pacientes com e sem SBY e foi observado não haver diferença sorológica para *Mycoplasma* spp. e *Chlamydia* spp. em ambos os grupos de pacientes. Além disso, a PCR também resultou negativa para estes agentes exceto para *Borrelia* spp., cujo sequenciamento do fragmento demonstrou 99% de homologia com *B. burgdorferi*. Os resultados moleculares foram obtidos desenhando-se novos iniciadores para amplificação do principal gene envolvido na síntese do gancho flagelar de *Borrelia* spp., chamado *flgE* (SAL et al., 2008), com os quais foi observada positividade de 60% em pacientes sintomáticos para SBY.

O gene *flgE* de *B. burgdorferi* possui 1,119 nucleotídeos de comprimento e está localizado na posição 950kb do cromossomo linear de *B. burgdorferi*. A sequência deste gene tem demonstrado 100% de identidade com outras cepas de *B. burgdorferi*, porém também foram observadas 73% de homologia com *Treponema phagedenis* e aproximadamente 50 % similaridade com gene *flgG* de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (JWANG et al., 1995).

Este gene, atualmente se tornou alvo para detecção do agente da borreliose no Brasil, pois apesar das espiroquetas observadas em pacientes com SBY se apresentarem com morfologia atípica e sem flagelos, o teste sorológico destes pacientes por meio da técnica de western blotting tem indicado a presença de anticorpos contra proteínas flagelares de *B. burgdorferi* (41 Kda). Este fato levou pesquisadores a aprofundarem o estudo dos componentes flagelares deste agente que poderiam permanecer conservados. Assim, o êxito obtido com o uso dos iniciadores para o gene *flgE* em estudo com pacientes com SBY, leva a supor que este gene seja potencialmente preservado entre as diferentes cepas de *Borrelia* spp. (MANTOVANI, 2010).

#### **2.4 Babesia bigemina (Smith; Kilbourne, 1893) e B. bovis (Babés, 1888)**

O gênero *Babesia* (Starcovici, 1893) é classificado taxonomicamente no filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida, família Babesiidae e compreende protozoários intra-eritrocíticos caracterizados pela presença de um complexo apical e um citoesqueleto único, distinto de outros eucariotos (BOSE et al., 1995; GORDON; SIBLEY, 2005).

Diferentes espécies de *Babesia* spp. infectam animais domésticos e silvestres (DANTRAKOOL et al. 2004; PENZHORN, 2006; SILVA et al., 2007a), e apesar de nem todas serem completamente reconhecidas, nove destas espécies já foram descritas como responsáveis por causar infecção em bovinos e/ou bubalinos. Contudo, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* são as espécies mais importantes em muitos países tropicais e subtropicais do mundo (CALLOW, 1984; SOUZA et al., 2000b; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005).

*Babesia bigemina* se caracteriza pela sua distribuição mais uniforme na circulação sanguínea quando comparado com *B. bovis*. Esta espécie tem tamanho de 5-6µm e é mais longa do que o raio do eritrócito, sendo, por isso, chamada de grande *Babesia*. Sua morfologia está relacionada com o curso da infecção e com a cepa observada, mas a principal forma é a bigeminada, mais numerosa, constituída de elementos piriformes, que vão de um lado a outro do eritrócito, unidos em ângulo agudo. No entanto, outras formas podem ser encontradas,

como por exemplo, piriformes simples, arredondadas, amebóides, elípticas, trigeminadas ou quadrigemindas e raramente amorfas (IICA, 1987; BARREIRA et al., 2005; CHAUVIN et al., 2009).

Por outro lado, *B. bovis* encontra-se preferentemente na circulação sanguínea capilar, apresenta até 3µm e ocupa menos de um quarto do eritrócito (pequena *Babesia*). Sua morfologia varia, assim como para *B. bigemina*. Normalmente, formas anaplasmoides representam o primeiro estágio do seu ciclo evolutivo no hospedeiro vertebrado e formas arredondadas, mais numerosas, representam o estágio adulto deste parasito. A multiplicação de ambos os agentes, *B. bovis* e *B. bigemina*, ocorre por divisão binária transversal (IICA, 1987).

A enfermidade causada por estes agentes é comumente conhecida como babesiose bovina, mas também pode ser reportada como piroplasmose bovina ou febre do carrapato (UILENBERG., 2006). A babesiose tem grande importância para a criação de gado devido às significativas perdas econômicas (MADRUGA et al., 1984). Em bovinos, as perdas ocasionadas por esses dois hemoparasitas são atribuídas ao menor ganho de peso dos animais, decréscimo da produção de leite, infertilidade dos touros, abortos e mortalidade, além das perdas indiretas com o tratamento dos animais e com medidas profiláticas (MADRUGA et al., 2000; OLIVEIRA; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2004).

A infecção por *B. bigemina* e *B. bovis* já foi observada em bovídeos da Austrália, África, América, Ásia, e Europa (UILENBERG, 2006). No entanto, as áreas de ocorrência de babesiose bovina estão intimamente relacionadas com a distribuição e a dinâmica populacional do seu vetor, o carrapato *R. microplus* (OLIVEIRA; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2004; CHAUVIN et al., 2009), embora haja relatos apontando também outras espécies de *Rhipicephalus* spp. como transmissores (FRIEDHOFF, 1988; HABELA et al., 1995; SERGENT et al., 1931, 1945 *apud* UILENBERG, 2006). Além destas duas espécies de *Babesia*, no continente Asiático, a infecção por *Babesia orientalis* já foi relatada em bubalinos, tendo como vetor biológico o carrapato *Rhipicephalus haemaphysaloides* (LIU et al., 1997; ZHONGLING et al., 1997).

Do ponto de vista epidemiológico, uma área geográfica pode se encontrar em três situações distintas em função do vetor: ser considerada livre ou indene, quando o carrapato não está presente; áreas de instabilidade enzoótica, quando o vetor esporadicamente aparece e não há um equilíbrio entre infecção, imunidade e doença; e área de estabilidade enzoótica, quando o vetor se mantém presente ao longo do ano, sustentando os níveis de anticorpos contra os agentes em níveis elevados (GONÇALVES et al., 2000; OLIVEIRA; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2004). De uma forma geral, uma região é considerada em estabilidade enzoótica quando 75% dos animais com idade acima de nove meses são portadores de hemoparasitos. Para isto, uma população de carrapatos controlada em níveis economicamente viáveis é desejável para que essa estabilidade seja mantida (GONÇALVES et al., 2000).

Além da presença do carrapato, outro aspecto relevante para a epidemiologia da babesiose é a sua relação inversa com idade do animal (DOMINGUEZ et al., 2004). Os bovinos jovens são mais resistentes ao desenvolvimento de babesiose grave devido à presença de anticorpos colostrais, rápida resposta da imunidade celular e maior eritropoiese da medula óssea. Sendo assim, a primoinfecção precoce é importante pela menor susceptibilidade dos animais jovens que apresentaram quadros clínicos menos severos (BROWN et al., 2006).

A incidência de *Babesia* sp. na hemolinfa dos carrapatos e fatores imunossupressivos como imunidade passiva insatisfatória, o estresse, o estado nutricional, a época do ano, o manejo, o parto e o tipo de pastagem, podem também influenciar no surgimento da babesiose. Da mesma forma, as características genéticas dos animais contribuem para o surgimento da enfermidade, a exemplo do que ocorre com animais europeus que sabidamente

são mais sensíveis que o gado zebu e as raças indianas (BOCK et al., 1999; GONÇALVES et al., 2000; JONSSON, 2006).

A infecção do carrapato por *Babesia* sp. ocorre quando há ingestão de sangue de animal infectado contendo gametócitos, que se desenvolvem em gametas masculinos e femininos. A fusão destes gametas dá origem aos zigotos, que nas células intestinais do carrapato se multiplicam, dando origem aos quinetos móveis, capazes de migrar e invadir vários órgãos do carrapato, entre eles ovários e oócitos formados. Desta forma, ocorre a infecção da progênie, caracterizando a transmissão transovariana (UILENBERG, 2006).

Na progênie, ocorre esporogonia nos enterócitos das larvas em desenvolvimento e posterior dispersão de esporocinetos na hemolinfa, os quais atingem a glândula salivar, dando origem aos esporozoítos. Para *B. bovis*, os esporozoítos podem ser encontrados nas glândulas salivares das larvas a partir do segundo dia da alimentação, não persistindo após o estágio larval. Diferentemente, para *B. bigemina*, os esporozoítos são encontrados apenas após o oitavo dia de fixação, quando os carrapatos já se encontram na fase de ninfa, e permanecem até o estágio adulto, caracterizando a transmissão transestadial (DALGLIESH; STEWART, 1983; HODGSON, 1992; BOCK et al., 2004).

A transmissão de *Babesia* sp. para o hospedeiro vertebrado ocorre quando o carrapato vetor se fixa e inocula a saliva infectada. Os esporozoítos (forma infectante) entram na corrente circulatória e penetram nas hemácias, onde se desenvolvem em trofozoítos. Durante o desenvolvimento destes, a hemácia acaba por se romper, liberando-os para infectar outras hemácias. Esta etapa torna-se um círculo vicioso a partir do momento que os merozoítos são capazes de penetrar nas hemácias, desenvolverem-se e lisarem-nas, sem a necessidade de passar novamente pelo vetor. Alguns merozoítos podem se desenvolver em gametócitos dentro da hemácia e serem ingeridos pelo carrapato, fechando o ciclo (UILENBERG, 2006).

Relatos sobre transmissão transplacentária de *B. bovis* em bovinos não é muito frequente, porém já foram descritos na literatura, bem como a ocorrência de abortos (BARBOSA et al., 1994; BRACARENSE et al., 2001; OSAKI et al., 2002).

O período de incubação de *Babesia* sp. varia de 5 a 14 dias. Nos bovinos, a babesiose pode progredir de forma aguda a crônica, dependendo do curso da infecção. Os sinais clínicos quando aparecem são inicialmente devido à lise dos eritrócitos que levam a anemia, icterícia, hemoglobinúria, incoordenação motora e sintomas de hipertermia, depressão, dispneia e taquicardia (WRIGHT et al., 1989; KUTTLER, 1998). Uma característica importante de babesiose é que os animais que se recuperam da fase aguda tornam-se portadores (LEW; JORGENSEN, 2005) e a infecção pode persistir assintomaticamente por muitos anos (CHAUVIN et al., 2009).

Segundo Callow (1984), a babesiose causada por *B. bovis* é mais severa e difícil de controlar do que a causada por *B. bigemina*. A ocorrência de retenção de eritrócitos parasitados por *B. bovis* nos capilares da substância cinzenta do encéfalo (PATARROYO et al., 1982; KESSLER et al., 1983; RODRIGUES et al., 2005) torna a doença grave e os conseqüentes distúrbios neurológicos caracterizam a babesiose cerebral (KESLLER et al., 1983; SOARES et al., 2000b).

A evolução da babesiose também está intimamente ligada com a quantidade do inóculo, virulência da amostra e do estado nutricional do animal, além da idade do hospedeiro e sua imunidade passiva. Em áreas endêmicas, os bezerros recebem proteção de anticorpos colostrais aproximadamente até três meses de idade. Esta proteção pode persistir até os seis meses de idade para *B. bovis* e até três a quatro meses de idade para *B. bigemina* (JAMES et al., 1985), tendendo a baixar a partir do 28º dia após o nascimento (MADRUGA et al., 2001). Assim, é evidenciada a importância da primoinfecção nas primeiras semanas de vida, de forma que após a infecção a imunidade adquirida persiste por até quatro anos para *B. bovis* e por até três anos para *B. bigemina* (WRIGHT et al., 1990).

Em regiões com babesiose endêmica, o pico de parasitemia ocorre entre os seis meses e dois anos de idade, quando declina fortemente (MAHONEY; ROSS, 1972), sendo que para *B. bigemina* a produção de anticorpos inicia a partir do 14º dia pós-infecção (RUIZ et al., 2001). Portanto, deve-se atentar para a possibilidade de desenvolvimento de doença em bezerros no período de “janela imunológica”, quando os anticorpos maternos já declinaram e ainda não houve primoinfecção e soroconverção (SILVA, 2007b).

Apesar dos animais jovens serem considerados mais resistentes à doença clínica por *B. bigemina* e *B. bovis*, são eles os mais suscetíveis à infecção por estes parasitas (OLIVEIRA; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2004; OLIVEIRA et al., 2007). Desta forma, em condições de intensa infestação por carrapatos e, conseqüente inoculação de grande número de parasitos, animais de diferentes idades podem desenvolver a babesiose, muitas vezes com alta morbidade e mortalidade, especialmente em animais subnutridos e com baixa resistência imunológica (MADRUGA et al., 1986; SACCO et al., 2001; SILVA et al., 2007). Por outro lado, a infecção em animais adultos geralmente causa transtornos quando animais provenientes de área indene ou com rígido controle de carrapatos são introduzidos em área onde o agente etiológico está presente (MCCOSKER, 1981; ANTONIASSI et al., 2009) ou quando vivem em áreas de instabilidade enzoótica (OSAKI et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005).

No Brasil, os primeiros casos clínicos fatais de babesiose bovina foram observados por Fajardo (1901) em bezerros e bovinos adultos recém importados, no estado do Rio de Janeiro. Desde então, estudos sobre o status epidemiológico de algumas regiões do país vêm sendo realizados, geralmente relatando situação de estabilidade enzoótica (ARAÚJO et al., 1997; SOARES et al., 2000b; MADRUGA et al., 2000a; 2001; SOUZA et al., 2002; BERTO et al., 2008; GUEDES JR et al., 2008; FRANQUE et al., 2010; TRINDADE et al., 2010). Nestas áreas, não são esperados surtos da doença e nem mortalidade (GONÇALVES et al., 2000). No entanto, algumas microrregiões no sul (VIDOTTO et al., 1997; OSAKI et al., 2002; FARIAS, 2007) e no nordeste (MADRUGA et al., 1993; BARROS et al., 2005) são exceções por serem endemicamente instáveis, principalmente devido à ação do clima na biologia do vetor.

No semi-árido do nordeste brasileiro, Galiza et al. (2010) observaram a babesiose cerebral ocorrendo em cerca de 1% dos bovinos com doença do sistema nervoso na região. Já na região sul esta doença causa perdas econômicas consideráveis, especialmente no sul do Rio Grande do Sul, sendo a mais frequente entre as enfermidades causadas por *Babesia* sp. (ALMEIDA et al., 2006). Nas áreas de instabilidade enzoótica do sul do Brasil, os casos de babesiose cerebral ocorrem durante os meses de verão e outono e os animais de um a três anos de idade são os mais afetados (RODRIGUES et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006). Estes dados corroboram com Osaki et al. (2002) que observaram, tanto por critério sorológico quanto parasitológico, que 50% dos bezerros de um rebanho com alta taxa de infecção por *B. bovis* não haviam se infectado com este agente até os seis meses de idade, mesmo estando infestados por *R. microplus* já aos 30 dias de idade, em níveis baixos de infestação.

Em momento recente, dois surtos graves de babesiose cerebral ocorreram no sul do país. Em um deles, 40 bovinos adultos morreram em cerca de 40 dias após animais infectados serem introduzidos no rebanho até então livre do carrapato *R. microplus* (SCHILD et al., 2008). Em outro caso, 50,9% das novilhas de um rebanho morreram em cinco dias pelo mesmo motivo (ANTONIASSI et al., 2009).

Na região sudeste, a infecção por *Babesia* sp. tem sido reportada como endêmica em bovinos (PEREIRA et al., 2006; FRANQUE et al., 2010) e a maior incidência da doença é verificada em bezerros até oito meses de idade e em animais adultos que são oriundos de áreas livres de vetores (GONÇALVES, 2000). No entanto, D'Andrea et al. (2006) observaram áreas de instabilidade enzoótica para *B. bigemina* apenas em bovinos da raça Nelore do estado de São Paulo. No estado do Rio de Janeiro, estudos realizados na mesorregião norte

fluminense relatam situação de estabilidade enzoótica para *B. bovis* (SOARES et al., 2000b), porém, de forma heterogênea, pois alguns municípios estavam abaixo do limiar da estabilidade. Para *B. bigemina*, a mesma mesorregião foi considerada enzooticamente instável (SOUZA et al., 2000b).

Em 1931, foi observada na Índia, a presença de *B. bigemina* em lâmina de um bezerro bubalino submetido à autópsia. Em seguida, casos isolados de babesiose clínica em búfalos incriminaram *B. bovis* e *B. bigemina* como agentes causais, conforme revisado por Roychoudhury; Gautam (1979). Então, com o objetivo de verificar a suscetibilidade de bubalinos à infecção por *B. bigemina*, estes autores constataram que em condições normais os búfalos parecem refratários a essa infecção, uma vez que o protozoário não foi observado na circulação sanguínea após a inoculação. Por outro lado, em animais imunossuprimidos, *B. bigemina* apareceu no sangue periférico entre 8 e 9 dias após a infecção, mantendo-se por até 11 dias em níveis detectáveis por esfregaço sanguíneo, porém sem sinais clínicos.

No entanto, Muraleedharan et al. (1984) observaram ocorrências de *B. bigemina* em rebanho bubalino indiano, causando manifestações clínicas como anemia, hipertermia, com ou sem hemoglobinúria, que ocorriam entre duas e três semanas após a infestação pelo vetor. Já a doença causada por *B. bovis* não era frequentemente diagnosticada. Nesse país também foi observado que em regiões consideradas estáveis para o carrapato vetor, a infecção por *B. bigemina* podia ser detectada entre 4 e 7,4% da população de búfalos (MIRANPURI et al. 1988; MISHRA et al., 1998).

Na Austrália, Callow et al. (1976) inocularam sangue de um bubalino, proveniente de área infestada por *R. microplus*, em um bezerro *Bos tauros* suscetível e observaram o desenvolvimento de infecção por *B. bigemina*. Desta forma, demonstraram que o búfalo era portador do agente e que bovinos e bubalinos podiam compartilhar a mesma infecção.

Na Argentina, a ocorrência de *Babesia* sp. em 9,57% dos búfalos de seis estabelecimentos criatórios foi reportada por Jacobo et al. (2005) e na mesma região, Ferreri et al. (2008) observaram 34% dos bubalinos parasitados por *B. bovis*, sem que houvesse nenhum caso de doença clínica.

Há poucas informações na literatura com relação à dinâmica da infecção por *Babesia* sp. em búfalos no Brasil. Franzolin Neto et al. (1989) observaram a campo, que bezerros bubalinos de três a seis meses de idade podiam apresentar sinais clínicos de babesiose. Posteriormente, Guido et al. (1994) estudaram um rebanho de 500 bubalinos no estado de São Paulo e observaram todos negativos ao exame de esfregaço sanguíneo, porém 49,4% foram sororreagentes (GOMES, 2007).

Em 1997, Costa e colaboradores observaram apenas três animais com anticorpos contra *Babesia* sp. quando acompanharam um grupo de 20 bezerros bubalinos de zero até um ano de idade. Destes três animais, um foi positivo para *B. bovis* e outro para *B. bigemina*, com queda dos níveis de anticorpos colostrais aos 30 e 15 dias de idade, respectivamente. O animal positivo para *B. bigemina* foi novamente sororreagente com um ano de idade, o que representou aquisição de imunidade ativa. O terceiro animal foi positivo para *B. bovis* e *B. bigemina*, com queda dos níveis de anticorpos colostrais aos 15 e 2 dias de idade, respectivamente.

#### **2.4.1 Aplicações do teste ELISA e da PCR no diagnóstico de *B. bigemina* e *B. bovis***

Testes sorológicos são importantes ferramentas para a determinação da condição epidemiológica de uma região, indicando a necessidade ou não de adoção de estratégias de controle que possam minimizar os efeitos da enfermidade (MADRUGA et al., 2001), assim como para avaliar as medidas tomadas (OSAKI et al., 2002).

A detecção de anticorpos contra *Babesia* spp. pode ser realizada por diferentes testes sorológicos, sendo a RIFI e o ELISA os métodos mais utilizados. Contudo, devido à automatização, à capacidade de testar muitas amostras ao mesmo tempo e à menor subjetividade, atualmente o ELISA tem sido cada vez mais empregado no diagnóstico da babesiose bovina (FERRERI et al., 2008; GUEDES JR et al., 2008; FRANQUE, 2010), embora a RIFI ainda seja mundialmente executada (SINGH et al., 2007; BERTO et al., 2008).

A maioria dos trabalhos soropidemiológicos recentes realizados no Brasil faz uso do ELISA indireto com extrato total do agente etiológico como antígeno (SOARES et al., 2000b; GUEDES JR et al., 2008; FRANQUE, 2010; TRINDADE et al., 2010). Porém, problemas no uso de antígeno bruto têm sido reportados, principalmente devido à falta de especificidade (EL-GHAYSH et al., 1996) e por frequentemente conterem componentes celulares do hospedeiro que podem aumentar as reações inespecíficas (BÖSE et al., 1995).

Desta forma, ensaios utilizando anticorpos monoclonais e antígenos recombinantes têm sido elaborados. Molloy et al. (1998) desenvolveram um ELISA competitivo altamente específico, baseado em anticorpos monoclonais para o epítipo único (58kD) de *B. bigemina*, com o qual obtiveram sensibilidade e especificidade de 95,7% e 97,0%, respectivamente. Boonchit et al. (2002) utilizaram a proteína purificada RAP-1 de *B. bovis*, sabidamente imunodominante e bem conservada, como antígeno de um ELISA indireto; e Dominguez et al. (2004), elaboraram um ELISA competitivo utilizando o antígeno recombinante MSA-2c de *B. bovis* e anticorpos monoclonais. Todos os ensaios se mostraram altamente capazes de identificar anticorpos específicos contra o agente pesquisado.

No entanto, apesar da alta especificidade destes testes, a técnica empregada para o desenvolvimento deles requer tecnologia mais elaborada, nem sempre disponível, além de serem testes mais demorados. Segundo Böse et al. (1995), há ainda a necessidade de validar testes realizados com antígenos recombinantes frente a soros de muitas regiões distintas.

O ELISA com antígeno bruto tem apresentado sensibilidade alta e especificidade aceitável como teste de triagem. Por estas razões, pesquisas alternativas para o aumento do desempenho de antígenos brutos ainda devem ser encorajadas (MADRUGA et al., 2001).

Técnicas de ELISA usando antígeno bruto foram desenvolvidas com cepas brasileiras tanto para *B. bigemina* quanto para *B. bovis* com sensibilidades e especificidades de 98,0% e 99,0% para o primeiro agente e 98,0% e 98,1% para o segundo (MADRUGA et al., 2000a; 2001). Ruiz et al. (2001), também utilizando antígeno total em um ELISA para detecção de imunoglobulina M (IgM) contra *B. bigemina*, obtiveram sensibilidade de 87,5% e especificidade de 94,0%. Em todos os testes, os valores de sensibilidade e especificidades foram obtidos analisando amostras de soro de bovinos livres de carrapato e de bovinos sabidamente infectados por *Babesia* sp.

Ambos os testes desenvolvidos por Madruga et al. (2000b; 2001) apresentaram resultados de sensibilidade e especificidades semelhantes a outros ELISAs com antígeno bruto extraído de hemácias parasitadas (GONÇALVES; PASSOS, 1995) ou com antígeno de subunidade recombinante (MOLLOY et al., 1998). Além disso, nenhum soro positivo para *B. bigemina* reagiu ao antígeno de *B. bovis* e vice-versa.

No Brasil, diversas regiões têm sido avaliadas quanto à situação enzoótica para as babesioses em bovinos por meio do ELISA indireto com antígeno bruto de *B. bigemina* e *B. bovis*, como segue em respectivo: 90,5% e 91,7% em Araguaína-TO (TRINDADE et al., 2010), 99,2% e 98,8% no noroeste do Pará (GUEDES JR et al., 2008), ambos no norte do país; variações entre 56,4-95,5% e 53,0-91,3% no semi-árido da Bahia, nordeste do país (BARROS et al., 2005); 69,7% e 91,0% no norte Fluminense-RJ, região sudeste (SOUZA et al., 2000b; SOARES et al., 2000b); 94,3% e 83,9% no Pantanal-MS, centro-este (MADRUGA et al., 2001); e 64,2% para *B. bovis* em Umuarama-RS, na região sul do Brasil (OSAKI et al., 2002).

São poucos os estudos sorológicos sobre *B. bigemina* e *B. bovis* em bubalinos e a maioria dos trabalhos utilizam a RIFI como teste diagnóstico. Assim, a análise de uma população de 100 bubalinos da Índia revelou uma frequência de 21% de positivos para *B. bigemina* (SINGH et al., 2007). No Brasil, Costa et al. (1997) acompanharam durante um ano 20 bezerros no estado de São Paulo e observaram 15% de soropositivos para *Babesia* sp.

Recentemente, Gomes (2007) utilizou o ELISA indireto com antígeno bruto para avaliar a resposta imune de bezerros e suas mães aos agentes da TPB, concluindo que os búfalos da região de Selvíria, no estado de Mato Grosso do Sul, são portadores resistentes dos agentes da babesiose e anaplasmose. Em um estudo realizado na Argentina, foi utilizado ELISA competitivo para mensurar anticorpos específicos para o antígeno de superfície MAS-2c de *B. bovis* com ajuda de anticorpos monoclonais. O teste revelou 21 animais positivos de uma população de 103 búfalos (FERRERI et al., 2008).

O exame microscópico de esfregaços sanguíneos corados por Giemsa é tradicionalmente usado para confirmar a babesiose aguda, porém, após a recuperação do animal, a parasitemia pode cair a níveis não detectáveis por esta metodologia, ou seja, menos que um parasita por  $10^5$ - $10^6$  eritrócitos (BÖSE et al., 1995). Além disso, a infecção por *B. bovis*, mesmo na fase aguda, tende a apresentar baixa parasitemia, o que dificulta a análise por esfregaço (OSAKI et al., 2002). Desta forma, técnicas de detecção direta do agente com maior sensibilidade, como a PCR, são necessárias para um diagnóstico mais preciso (ALMERIA et al., 2001).

Diversas pesquisas têm sido realizadas para padronizar e aprimorar a PCR como método de diagnóstico (FIGUEROA et al., 1993; LINHARES et al., 2002; LEW; JORGENSEN, 2005). No entanto, esta técnica também vem sendo amplamente usada para comparação gênica de *Babesia* spp. e na compreensão das relações entre este agente e seus hospedeiros. Assim, estudos têm se concentrado principalmente na caracterização genética e antigênica das proteínas maiores de superfície, antígenos imunodominantes com capacidade antigênica e genes que são expressados por famílias de genes polimórficos (SUAREZ et al., 1994, 2003; MCELWAIN et al., 1998; WILKOWSKY et al., 2003; RAMOS et al., 2009; TORINA et al., 2010).

No diagnóstico dos agentes das babesioses em bovinos, apesar de muitas publicações reportarem o uso da PCR, a maioria está baseada em algumas metodologias originais: Figueroa et al. (1992) para um fragmento de 300pb obtido, por meio enzimas de restrição (SpeI-AvaI), de um fragmento de 6,3kpb do genoma de *B. bigemina* inserido no plasmídeo *pBR322*, segundo metodologia descrita por Buening et al. (1990); Suarez et al. (1991) para o gene *RAP-1* que codifica uma proteína de superfície do merozoíto (60-kDa) e Fahrimal et al. (1992) para um fragmento do gene apocitocromo b (*Bo6*), ambos específicos para *B. bovis*.

Além destes, Figueroa et al. (1993) desenvolveram uma técnica de PCR multiplex para identificar os três agentes da TPB, utilizando pares de iniciadores específicos para *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*, seguida de uma *nested* PCR (nPCR) com sondas não radioativas específicas. No entanto, apesar de ter sido considerada suficiente para detectar o estado portador em bovinos infectados, a sensibilidade desta técnica foi reduzida em relação à PCR simples para *Babesia* spp.

Técnicas de RT-PCR também têm sido desenvolvidas para o diagnóstico de *Babesia* sp. Kim et al. (2007) padronizaram uma RT-PCR para a amplificação do gene *18SrRNA* capaz de detectar 2,5 parasitos/ $\mu$ L de sangue com 100% de especificidade e 100% de sensibilidade em relação a bovinos portadores assintomáticos. Esta técnica foi comparada com as nPCRs desenvolvidas por Figueroa et al. (1992) e Fahrimal et al. (1992), e apresentaram níveis de detecção e especificidade idênticos. Contudo, a RT-PCR vem sendo principalmente usada para o estudo da expressão gênica de *Babesia* spp. e não com aplicações diagnósticas (LÖHR et al., 2002; SUAREZ et al., 2003).



No Brasil, a PCR também tem sido aplicada no estudo de *Babesia* sp. tanto no hospedeiro vertebrado quanto no vetor (OSAKI et al., 2002; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007), grande parte reproduzindo a técnica nPCR desenvolvida por Figueroa et al. (1992; 1993). No entanto, Linhares et al. (2002) elaboraram uma reação de PCR com alta sensibilidade utilizando iniciadores desenhados para o gene *18SrRNA* de *B. bigemina* e *B. bovis*. A técnica apresentou capacidade de detecção de até  $10^{-7}$ % de parasitemia ou aproximadamente 3 parasitas/mL de sangue com 100% de especificidade. Desta forma, a técnica foi considerada tão sensível e específica quanto às elaboradas por Figueroa et al. (1992, 1993) e Fahrimal et al. (1992).

O gene *18SrRNA* tem sido empregado em técnicas de PCR com objetivo de diagnóstico por apresentar regiões variáveis entre *B. bigemina* e *B. bovis* que permitem discriminá-las especificamente (LINHARES et al., 2002; OLEGARIO et al., 2007; BULING et al., 2007). Além disso, dados moleculares obtidos recentemente por meio deste gene têm contribuído significativamente para uma melhor compreensão da filogenia do gênero *Babesia* e fornecido novas informações para ajudar a determinar a posição taxonômica de muitas espécies (HUNFELD et al., 2008).

Buling et al. (2007), utilizando o gene *18SrRNA*, observaram alta similaridade entre cepas de *B. bigemina* de diferentes países (99,9 a 100%), demonstrando conservação do gene *18SrRNA* dentro desta espécie. Por outro lado, apesar de também demonstrar alta similaridade entre as sequências de diferentes cepas depositadas no GenBank, *B. bovis* apresentou maior divergência genética, com percentual de similaridade variando entre 97,3 e 99,9%.

São raros na literatura trabalhos com aplicação da técnica de PCR no diagnóstico das babesioses em bubalinos. Em um trabalho realizado na Argentina, Ferreri et al. (2008) compararam os resultados obtidos por meio de um ELISA competitivo e nPCR para diagnóstico de *B. bovis* em 103 búfalos. Neste estudo, foram observados 20% de positivos no ELISA e 34% na nPCR, não havendo associação entre os resultados positivos dos dois testes.

## 2.5 *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910)

Espécies do gênero *Anaplasma* são classificadas dentro da ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, onde se encontram as bactérias intracelulares obrigatórias que se replicam dentro de vacúolos no citoplasma de células eucarióticas. *Anaplasma* spp. inclui três espécies que infectam ruminantes: *Anaplasma marginale*, *Anaplasma marginale* ss. *centrale* (mais conhecida como *A. centrale*) e *Anaplasma ovis*. No entanto, com a reclassificação filogenética ocorrida em 2001 (DUMLER et al., 2001), foram incluídas também as espécies: *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis* e *Anaplasma platys*, os quais eram anteriormente conhecidos como *Ehrlichia equi* ou *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia bovis* e *Ehrlichia platys*, respectivamente.

As primeiras observações de *A. marginale* datam do final do século XIX, quando estruturas observadas nas extremidades das hemácias de bovinos foram consideradas como uma das formas do ciclo de vida de *Babesia bigemina*. No entanto, a enfermidade foi primeiramente descrita na África do Sul, por Theiler (1910), ao observar “pontos marginais” em eritrócitos de bovino doente, reconhecendo-os como agentes causais de uma doença específica, os quais foram denominados *A. marginale* (KOCAN et al., 2010).

Conhecida como anaplasmosse bovina, a enfermidade causada por *A. marginale* gera significativas perdas econômicas devido à mortalidade de animais, a diminuição da produtividade do rebanho e custos com tratamento (KOCAN et al., 2003). A anaplasmosse é disseminada mundialmente em áreas tropicais, subtropicais e em algumas áreas de clima temperado (KOCAN et al., 2010), apresentando grande importância tanto em áreas de

instabilidade enzoótica como nas áreas de estabilidade, devido à introdução de animais provenientes de áreas livres de vetores (KESSLER et al., 1987, DALGLIESH et al., 1990).

A anaplasmose bovina é considerada enzoótica em quase todos os estados dos EUA, no México, América Central e América do Sul, bem como nas Ilhas Caribenhas, além da Ásia e África, com exceção de áreas desérticas e montanhosas (GUGLIELMONE, 1995; KOCAN et al., 2010). Há relatos de casos da doença no Canadá (KOCAN et al., 2010) e, na Europa, a enfermidade é encontrada principalmente em cidades mediterrâneas (DE LA FUENTE et al., 2005a).

A infecção por *A. marginale* acomete somente ruminantes, especialmente bovinos, mas também pode infectar búfalos aquáticos (*B. bubalis*), Bison Americano (*Bison bison*), cervídeos, entre outros ruminantes silvestres (KUTTLER, 1984; ZAUGG et al., 1996; KOCAN et al., 2004b). Recentemente, Kocan (2010) afirmou que animais silvestres infectados são potencialmente importantes na epidemiologia e disseminação da anaplasmose porque podem atuar como reservatórios de *A. marginale* e servirem como fonte de sangue infectado.

A transmissão de *A. marginale* pode ser efetuada tanto biologicamente, por carrapatos, quanto mecanicamente, por insetos hematófagos e fômites (KESSLER, 2001; KOCAN et al., 2004a). Também há relatos de transmissão transplacentária, principalmente quando a infecção se desenvolve durante o período gestacional, mas também pode ocorrer em vacas portadoras crônicas. Em um estudo com vacas prenhes inoculadas com *A. marginale* durante o terceiro trimestre de gestação foi observada infecção com parasitemias variando de 1,6 a 6,0%, sem presença de aborto. Após o parto 36,0% dos bezerros apresentaram anticorpos contra *A. marginale* antes da ingestão de colostro. Enquanto que soros fetais coletados em frigoríficos registraram apenas 2,1% de positivos (RIBEIRO et al., 1995).

Entre os transmissores mecânicos da anaplasmose bovina já foram apontados moscas hematófagas dos gêneros *Tabanus*, *Stomoxys*, *Chrysops*, *Siphona* e mosquitos do gênero *Psorophora* (RISTIC, 1968; EWING, 1981). Segundo Roberts; Love (1977) *A. marginale* mantém-se viável nas peças bucais por até dois dias após ingestão por tabanídeos. Entretanto, são poucos os trabalhos experimentais sobre a transmissão de *A. marginale* por insetos hematófagos (KESSLER, 2001).

Existem aproximadamente 20 espécies de carrapatos incriminados como possíveis vetores de *A. marginale* em todo o mundo (EWING, 1981), entre elas encontram-se, principalmente, *R. microplus*, outras espécies de *Rhipicephalus* sp., *Ixodes* sp., *Hyalomma* sp., *Argas* sp. e *Dermacentor* sp. enquanto que o gênero *Amblyomma* parece não transmitir *A. marginale* (KESSLER, 2001; KOCAN et al., 2010). Entretanto, além destes, uma recente análise da prevalência de *A. marginale* em bovinos e ruminantes silvestres na Europa sugerem a possibilidade de que espécies de carrapatos não reconhecidas como vetores possam atuar nessa região (DE LA FUENTE et al., 2004a).

Contudo, na lista de possíveis vetores de *A. marginale* são observadas discordâncias entre os autores sobre a capacidade de transmissão do agente por algumas espécies de carrapatos. Esta inconsistência pode derivar das diferenças entre as cepas de *A. marginale*, de forma que algumas não são infectantes para carrapatos ou não transmissíveis pelos mesmos (KOCAN et al., 2004; 2010). Desta forma, a transmissão mecânica é a maior fonte de disseminação de *A. marginale* em certas áreas onde os carrapatos vetores estão ausentes (EWING, 1981), quando há cepas não infectantes para carrapatos ou onde *R. microplus*, parece não ser vetor biológico do agente (FIGUEROA et al., 1998; CORONADO, 2001; DE LA FUENTE et al., 2001).

A transmissão de *A. marginale* por carrapatos pode ocorrer tanto de forma transestadial quanto intraestadial. Esta última, especialmente, ocorre quando o carrapato macho se infecta em um bovino portador e transmite em seguida para outro bovino sensível.

Fato que enfatiza a importância epidemiológica dos machos, devido sua grande mobilidade, longevidade e capacidade de se tornarem persistentemente infectados com o patógeno, transmitindo-o repetidamente enquanto se transfere de um bovino a outro (KESLLER et al., 2001; KOCAN et al., 1992a; b; PALMER et al., 2001).

Há controvérsias quanto à transmissão transovariana de *A. marginale* e a maioria dos trabalhos reportam a inexistência dessa via de infecção para o carrapato (STICH et al., 1989). Porém, a presença de DNA deste agente em ovos e larvas originárias de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* já foi observada (MOURA et al., 2003; SHIMADA et al., 2004), mas sem confirmação de que esta progênie fosse capaz de transmitir o agente a um hospedeiro susceptível, o que aumentaria em muito o risco da manutenção da infecção entre os animais.

*Anaplasma marginale*, quando ingeridos pelo carrapato, infectam as células intestinais, onde se desenvolvem e depois se disseminam por diversos outros tecidos, incluindo a glândula salivar (KOCAN et al., 1992a; b; 2004a). Em cada local de infecção no carrapato, *A. marginale* se desenvolve dentro de membranas ligadas a vacúolos, apresentando duas formas. A primeira forma é a reticulada (forma vegetativa) que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que podem conter centenas de organismos. Posteriormente, a forma reticulada muda para a forma densa, que é a forma infectante e que pode sobreviver fora da célula. O hospedeiro vertebrado torna-se infectado quando a forma densa é transmitida durante a alimentação do carrapato via glândula salivar (KOCAN et al., 2004a; 2010).

Os eritrócitos são o único local de infecção de *A. marginale* em ruminantes (KOCAN et al., 2010), onde formam inclusões ligadas a membrana, também chamadas de corpúsculos de inclusão. Estes corpúsculos contêm de quatro a oito corpúsculos iniciais, que durante uma parasitemia aguda, podem infectar até 70% dos eritrócitos (RISTIC, 1977; RICHEY, 1981). Em áreas endêmicas, segundo Corrier e Guzman (1977), bezerros bovinos sofrem primoinfecção entre um e seis meses de idade. O período de incubação da infecção varia com a dose infectante, indo de 7 a 60 dias com média de 28 dias. A eliminação dos eritrócitos infectados ocorre por fagocitose realizada pelas células do sistema monocítico-fagocitário, podendo resultar em anemia fraca ou severa e icterícia, sem hemoglobinúria ou hemoglobulinemia (RISTIC, 1977).

Os sinais clínicos da anaplasmosose podem incluir ainda febre, perda de peso, aborto e letargia, podendo ocorrer mortes em animais acima de dois anos de idade (RISTIC, 1977). Os animais que sobrevivem à infecção aguda desenvolvem infecções persistentes, caracterizadas por ciclos de baixa parasitemia flutuantes entre menos que  $10^4$  até cerca de  $10^6$  eritrócitos infectados/mL (ERIKS et al., 1989; KIESER et al., 1990) e possuem imunidade ao longo da vida, não desenvolvendo doença quando exposto a nova infecção (RISTIC, 1977). No entanto, esses animais com baixo percentual de eritrócitos parasitados são capazes de infectar teleóginas de *R. microplus* (MOURA et al., 2003).

No Brasil, a infecção por *A. marginale* é considerada endêmica e o carrapato vetor mais importante é *R. microplus* (GUGLIELMONE, 1995; VIDOTTO et al., 1998; BRAZ et al., 2000). A ocorrência de dois isolados brasileiros de *A. marginale*, morfologicamente distintos, cuja diferença se baseia na presença ou ausência de uma estrutura filamentosa aderida ao corpúsculo de inclusão (apêndice), já foram observados (PATARROYO et al., 1987, 1994; RIBEIRO et al., 1997).

O isolado de *A. marginale* sem apêndice foi antigenicamente caracterizado (PATARROYO et al., 1994) e mostrou-se infectante para *R. microplus* (RIBEIRO; LIMA, 1996). Enquanto que um isolado brasileiro de *A. marginale* com apêndice, foi infectante para os bovinos, porém não foi transmissível por *R. microplus* (RUIZ et al., 2002). Fato que reporta a importância que pode ter a transmissão mecânica na epidemiologia de *A. marginale* no Brasil. Conclusão favorecida pelo clima tropical, que favorece o ciclo de vida de dípteros

hematófagos, que são conhecidos pela capacidade de transmitir de *A. marginale* (DE LA FUENTE et al., 2004a).

Na maioria das regiões do Brasil a situação epidemiológica da anaplasmose bovina é de estabilidade enzoótica (RIBEIRO; REIS, 1981, DALAGNOL et al., 1995, ARAÚJO et al., 1998). Poucas são as áreas caracterizadas como de instabilidade; a exemplo do sertão de Sergipe (OLIVEIRA et al., 1992) e o extremo sul do Rio Grande do Sul (ARTILES et al., 1995). Nestas áreas os fatores ecológicos e climáticos não favorecem o desenvolvimento de *R. microplus* e de dípteros hematófagos, transmissores de *A. marginale*.

São poucos os estudos sobre a anaplasmose em bubalinos, indicando grau de parasitemia, sinais, sintomas e consequências econômicas. Contudo, sabe-se que búfalos, assim como bovinos, são suscetíveis à infecção, porém com menor incidência. Em estudo comparativo da infecção por *A. marginale* em ambas as espécies, foi observado que 30% (75/250) dos búfalos e 52% (130/250) dos bovinos estavam infectados, tendo sido constatada a infecção por *A. marginale* e *A. centrale*. Não foi observada diferença entre machos e fêmeas e os achados revelaram ainda que os carrapatos que parasitavam bovinos apresentaram maior percentual (63,41%) de infecção por *A. marginale* do que os coletados em bubalinos (36,59%) (RAJPUT, et al., 2005).

Na Índia, Reddy et al. (1988), observaram, em bubalinos inoculados experimentalmente, manifestações clínicas como febre (média de 38,8°C), anorexia, pêlos ásperos, palidez de mucosas, descarga nasal e ocular e debilidade, além de desenvolvimento de parasitemia de 8,5%, em média 29 dias após a infecção. E Sharma (1987) ao infectar experimentalmente 7 bubalinos, observou manifestações clínicas de anaplasmose em apenas 5 animais (3 esplenectomizados e 2 intactos). Verificou ainda que medicamento imunossupressivo não causou aumento significativo da parasitemia, exceto em um animal, e que búfalos intactos não imunossuprimidos mostraram rara parasitemia (<1%), permanecendo aparentemente saudáveis.

Em trabalho realizado na Argentina, Jacobo et al. (2005) observaram 61,7% (71/115) dos bubalinos positivos para *A. marginale*, por meio de esfregaço sanguíneo. Além disso, devido à baixa frequência de carrapatos encontrada e ao fato de haver maior número de animais infectados com *A. marginale* do que com *Babesia* sp. (11), foi sugerido que a fonte de infecção pode não estar relacionada com o carrapato, mas principalmente com manobras de manejo sem cuidados sanitários, muito comuns em criações bubalinas. Isto permitiria inferir que o búfalo pode constituir-se em fonte de infecção para bovinos em áreas livres, quando são incorporados sem os controles sanitários pertinentes.

### **2.5.1 Aplicações do teste ELISA e da PCR no diagnóstico de *A. marginale***

Apesar do diagnóstico laboratorial de *A. marginale* ser muitas vezes baseado na observação de esfregaços sanguíneos, este método não possui a alta sensibilidade desejável. Em casos de animais portadores adultos, são detectados baixos níveis de parasitos no sangue e os esporádicos aumentos de parasitemia dificilmente atingem a ordem de 0,3% (GONÇALVES et al., 2000). Desta forma, para estudos epidemiológicos e nos casos de animais permanentemente infectados ou portadores assintomáticos, o diagnóstico imunológico e o baseado em técnicas de biologia molecular são os meios comumente empregados (KOCAN et al., 2010).

O diagnóstico de *A. marginale* consiste basicamente na detecção das proteínas principais de superfície (MSP)s conservadas ou seus respectivos genes. Para isso, a caracterização genética e antigênica de cepas de *A. marginale* é importante para identificar genes ou epítomos altamente conservados (KANO et al., 2002).

Entre as MSPs conhecidas, seis (MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4, MSP5) já tiveram seus genes clonados, sequenciados e expressados (BARBET et al., 1987; BARBET; ALLRED, 1991; VISSER et al., 1992; OBERLE et al., 1993; ALLEMAN et al., 1997). Estas proteínas são antígenicamente relacionadas e encontradas em todas as cepas de *A. marginale*, induzindo a produção de anticorpos em animais que tiveram infecção natural ou vacinados com corpúsculos iniciais desta rickettsia (TEBELE et al., 1991).

Entre diferentes isolados de *A. marginale*, a variabilidade antigênica das proteínas MSP1b, MSP2 e MSP3 demonstram a diversidade genética das sequências responsáveis por estas proteínas, codificadas por uma família de múltiplos genes polimórficos que variam principalmente em animais persistentemente infectados (BOWIE et al., 2002). Por outro lado, MSP1a, MSP4 e MSP5 possuem epítomos conservados, por serem codificados por genes que não variam durante a multiplicação da bactéria. Fato que os tornam importantes por então definir alvos comuns e específicos (KANO et al., 2002), úteis para técnicas diagnósticas e desenvolvimento de vacinas.

Muitas técnicas sorológicas têm sido descritas para o diagnóstico de infecções por *A. marginale*, incluindo teste de aglutinação em cartão (ALMERAULT; ROBY, 1968), imunofluorescência, fixação de complemento (GONZALEZ et al., 1978), radioimunoensaio (SCHUNTNER; LEATCH, 1988) e ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) (THOEN et al., 1980). Dentre estes, o ELISA é o teste mais aplicado (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998; MADRUGA et al., 2000b; ARAÚJO et al., 2005; MELO et al., 2007).

O ELISA tem apresentado maior sensibilidade que os demais testes sorológicos, porém sua especificidade varia principalmente quanto ao antígeno utilizado (RAMOS et al., 2010). Alguns ELISAs utilizam como antígeno, corpúsculos iniciais de *A. marginale* parcialmente purificados de eritrócitos bovinos infectados (MADRUGA et al., 2000; 2001; FRANQUE et al., 2010). Estudos relatam que o uso deste tipo de antígeno pode reagir inespecificamente com anticorpos anti-eritrócitos presente no soro dos animais testados (BARRY et al., 1986; DUZGUN et al., 1988; KNOWLES et al., 1996). No entanto, Madruga et al. (2000) observaram alta especificidade (94%) com o uso de antígeno total, além de alta sensibilidade (100%), tendo a RIFI como teste padrão.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, surgiu a possibilidade de produção de grandes quantidades de proteínas heterólogas em culturas bacterianas. Assim, pesquisas voltadas para o desenvolvimento de testes sorológicos para *A. marginale* estão sendo focadas nas proteínas de membrana dos corpúsculos iniciais, apesar das dificuldades inerentes a sua produção (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998; SILVA et al., 2006).

A proteína MSP5 tem mostrado grande potencial para ser utilizada como antígeno em diagnóstico sorológico, devido às suas características de conservação entre diferentes espécies e isolados de *Anaplasma* sp. (VISSER et al., 1992, NDUNG'U et al., 1995). Melo et al. (2007), ao desenvolverem um ELISA com MSP5 recombinante truncada, observaram que o ensaio apresentou 97,0% de sensibilidade e 100% de especificidade, ao testar 66 soros de animais infectados experimentalmente com *A. marginale* e 96 soros negativos, com o estado de infecção destes animais confirmado por PCR. Nos animais infectados experimentalmente, o ELISA detectou anticorpos a partir do 12º dia pós-infecção, enquanto que a PCR começou a detectar ricketsemia a partir do 9º dia. A sensibilidade e a especificidade deste teste foram superiores às do ELISA competitivo usando MSP5 desenvolvido por Torioni de Echaide et al. (1998) (96% e 95%), provavelmente devido a diferenças no preparo do antígeno, além do fato de nPCR ter sido o padrão ouro do teste.

Além destes, dois ELISAs indiretos baseados em MSP1a e MSP2 de *A. marginale* foram desenvolvidos por Araújo et al. (2005), com os quais foram observadas sensibilidade de 99% e especificidade de 100% para ambos, tendo a RIFI como padrão. Os testes apresentaram

alta concordância e ambos os antígenos foram reconhecidos por 583 soros de bovinos de diferentes regiões do Brasil, podendo ser usados em estudos epidemiológicos.

Recentemente, Ramos et al. (2010) compararam o uso das proteínas MSP5, MSP1a, MSP2 e um mix destas três, como antígeno para ELISA indireto. Desta forma, foi observada a sensibilidade de 84,8% para os três antígenos usados separadamente e de 91,5% quando usado o mix. Por outro lado, inesperadamente a especificidade não foi maior para este último, ficando em 98,7% para os quatro testes analisados.

Estudos confrontando testes realizados com proteínas recombinantes e antígeno total de *A. marginale* também já foram realizados. Silva et al. (2006), compararam um ELISA indireto baseado em MSP5 recombinante e outro com antígeno bruto e não observaram diferença significativa. Porém, Ramos et al. (2010) observaram maior sensibilidade (91,5%) e menor especificidade (93,3%) para um ELISA realizado com corpúsculos de inclusão quando comparado com os testes utilizando MSP5, MSP1a, MSP2 e um mix das três, citados anteriormente. Fato supostamente atribuído à utilização da PCR como teste de referência, enquanto Silva et al. (2006) utilizaram a RIFI, que normalmente possui sensibilidade inferior a do ELISA.

Neste contexto, Melo et al. (2007) ressaltaram que o desenvolvimento de um teste diagnóstico deve sempre ser comparado a outro de maior sensibilidade e especificidade, como a PCR, sob risco de superestimar estes parâmetros para o teste que estiver sendo padronizado. Contudo, deve-se atentar ao fato de que os testes sorológicos e a PCR possuem alvos distintos e nem sempre correlacionados no momento da coleta de material e análise (FERRERI et al., 2008).

De uma forma geral, os estudos mostram que apesar do ELISA com antígeno bruto apresentar menor especificidade que os testes com proteínas purificadas, apresenta uma sensibilidade alta e uma especificidade aceitável para uso em estudos soroepidemiológicos e como teste de triagem (MADRUGA et al., 2000).

Com este fim, tanto o uso de antígeno bruto quanto purificado têm sido observados em trabalhos realizados no Brasil. No estado da Bahia, Barros et al. (2005) constataram prevalência de 98,9% usando ELISA com antígeno bruto e 97% usando MSP5, de forma que os dois testes mostraram associação altamente significativa, corroborando Araújo et al. (1998), que observaram 96,9% de sororreagentes com antígeno bruto. Enquanto que, um trabalho realizado em três diferentes regiões do estado de Pernambuco revelou 88,9% dos soros testados positivos para MSP1a e 90,2% MSP2 (ARAÚJO et al., 2005). Já na região norte, Guedes Jr et al. (2008) observaram 68,3% de bovinos positivos para MSP1a de *A. marginale* no estado do Pará; e no sul do país foram observadas positivities para MSP5 de *A. marginale* em 58,7% dos bovinos estudados na região sul do estado do Paraná (MARANA et al., 2009); 87,5% na região norte do Paraná (VIDOTTO et al., 1998); e em 76,1% dos animais avaliados na região noroeste deste mesmo estado (YOSHIHARA et al., 2003).

Na região sudeste há poucos trabalhos epidemiológicos sobre *A. marginale*, contudo, em pesquisa recente, Franque (2010), utilizando antígeno bruto deste agente, observou 96,6% dos bovinos, da mesorregião Espírito-santense – ES, reagentes positivos ao teste ELISA indireto; e no estado do Rio de Janeiro, Souza et al. (2000a) avaliaram a prevalência de *A. marginale* em 532 amostras de soro de bovinos de nove municípios na mesorregião Norte Fluminense utilizando ELISA indireto com antígeno bruto e foi revelado que 485 (91,2%) estavam positivos.

A maioria dos trabalhos encontrados sobre anaplasmose em bubalinos tratam da comprovação da infecção por meio da observação de *A. marginale* em esfregaços sanguíneos, que geralmente revelam menor frequência que em bovinos. Desta forma, Rajaput et al. (2005) demonstraram que de 250 bubalinos estudados, 30% estavam positivos para *A. marginale*,

apresentando-se 26,8% menos suscetíveis a infecção que bovinos; e Miranpuri (1988) observou 6,2% e 14,9% de búfalos infectados com *A. marginale* em duas localidades da Índia.

No estudo sobre a detecção de anticorpos contra *A. marginale* em búfalos, Sharma (1987) realizou infecção experimental em bezerros búfalos para observar o início da detecção de anticorpos e a produção de anticorpos ficou entre 27 e 32 dias após a infecção. Com objetivo semelhante, Gomes et al. (2008) estudou o perfil da resposta imune-humoral em búfalas de um rebanho brasileiro, antes e após o parto, assim como de seus respectivos bezerros após o nascimento. Os resultados mostraram-se negativos durante os primeiros 90 e 105 dias após o parto e nascimento para búfalas e seus bezerros, respectivamente. Os bezerros pareceram adquirir imunidade somente após o contato com a bactéria.

Reações cruzadas têm sido relatadas em ELISAs utilizando antígeno bruto, como reportado por Madruga et al. (2000b), que observaram 6,7% de reações inespecíficas com *Babesia bovis* e 1,4% com *B. bigemina*, as quais foram consideradas de pouca significância e não foram diferenciadas de reação contra anticorpos anti-eritrocíticos. Da mesma forma, reações cruzadas em ELISAs utilizando antígenos recombinantes também já foram observadas, principalmente entre espécies de *Anaplasma* sp. quando utilizando antígeno derivado de proteína comum para este gênero, como ocorre com MSP5 (CARELLI et al., 2007).

A PCR para *A. marginale* tem sido frequentemente usada para estudos filogenéticos (DUMLER et al., 2001) e biogeográficos (DE LA FUENTE et al., 2007), baseados na expressão dos genes que codificam as MSPs, e para o sequenciamento genômico deste agente (BRAYTON et al., 2005).

Técnicas de PCR com alto grau de sensibilidade e especificidade têm sido desenvolvidas para identificar *A. marginale* (FIGUEROA et al., 1993; TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998; LEW et al., 2002; MOLAD et al., 2006). A nPCR, uma derivação da PCR convencional, foi desenvolvida na tentativa de se aumentar a capacidade de detecção de baixas concentrações de DNA. Com este objetivo, Torioni de Echaide et al. (1998) padronizaram uma nPCR para amplificação do gene *msp5* de *A. marginale* com uma sensibilidade equivalente a detecção de até 30 parasitos por mL de sangue na reação. A nPCR foi seguida de hibridização com sonda para assegurar especificidade e o teste de 235 amostras de bovinos detectou 64% de positivos. Neste mesmo trabalho, foi observado que com apenas primeira reação de PCR, três de sete animais persistentemente infectados não foram positivos, mas a nPCR detectou a infecção em todos. No entanto, Lew et al. (2002) desenvolveram posteriormente uma nPCR para detecção do gene *msp1a*, e assim, diferenciar espécies de *Anaplasma* sp., uma vez que *msp5* é comum entre elas.

Além da PCR simples, a RT-PCR também tem sido elaborada para detecção de cópias de genes de *A. marginale* tanto em material do hospedeiro vertebrado quanto de carrapatos com alta reprodutibilidade (LÖHR et al., 2002; FUTSE et al., 2003; CARELLI et al., 2007). Contudo, o custo de sua execução ainda é uma barreira, principalmente para uso com grandes amostragens, como ocorre em estudos epidemiológicos.

No Brasil, são poucos os trabalhos desenvolvidos com objetivo de diagnóstico utilizando PCR para *A. marginale* (PACHECO et al., 2004) e, em muitos casos esta técnica é realizada como teste de referência para o desenvolvimento de ensaios imunológicos (MELO et al., 2007; RAMOS et al., 2010), estudos sobre a diversidade genética do agente (FERREIRA et al., 2001; DE LA FUENTE et al., 2004b) e sobre a relação *A. marginale*-carrapato, como o realizada por Moura et al. (2003) que utilizou técnica de nPCR de Torioni de Echaide et al. (1998) para detectar a presença de *A. marginale* na progênie de *R. microplus* e, assim, verificar a transmissão transovariana.

Quanto a estudos com bubalinos, não foram encontrados trabalhos sobre *A. marginale* usando técnicas de PCR.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Estudo Sorológico de *B. burgdorferi* e Agentes da TPB em Búfalos do Estado do Rio de Janeiro, por Meio do ELISA Indireto.

##### 3.1.1 Obtenção das amostras

A localização das propriedades com criação de búfalos no estado do Rio de Janeiro foi realizada por intermédio das secretarias de agricultura e, principalmente, com apoio da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Rio de Janeiro (EMATER-RJ).

Constituindo a primeira etapa de um estudo transversal, a coleta de material biológico foi realizada de junho de 2008 a dezembro de 2009, buscando-se obter amostras de ao menos uma propriedade por microrregião possuidora de criatório bubalino no estado do Rio de Janeiro, segundo IBGE (2006). Desta forma, foram incluídas 17 propriedades situadas nos municípios de: Itaguaí, Casimiro de Abreu, Cachoeiras de Macacu, Rio Claro, Barra do Pirai, Campos Goytacazes, Vassouras, Teresópolis, Rio das Ostras, Itaboraí, Araruama, Macaé, Miracema, Rio de Janeiro e Cantagalo (**Figura 1**).

Na totalidade, foram coletadas, por conveniência, amostras sanguíneas de 316 búfalos jovens e adultos do estado do Rio de Janeiro. O sangue dos animais foi coletado de forma asséptica, por venopunção jugular, em tubos sem anticoagulante. Em seguida à coagulação, as amostras foram centrifugadas (6.000rpm/10minutos) e os soros obtidos foram aliqüotados em microtubos e armazenados a -20°C até o momento da análise sorológica.

O quadro presente no **Anexo B** mostra a distribuição detalhada das coletas, descrevendo o número de animais de cada propriedade visitada segundo o proprietário, o número de animais em que foi possível fazer a coleta de material, os municípios aos quais pertencem e suas respectivas micro e mesorregiões.

De acordo com o IBGE (2006), de todas as microrregiões com criatório bubalinos no estado do Rio de Janeiro, apenas Itaperuna e Três Rios não entraram na amostragem. Segundo informações concedidas pela Secretarias de Agricultura de Itaperuna, não havia mais propriedade com criação de bubalinos neste município e não foi obtida autorização para coleta na microrregião de Três Rios, em tempo hábil para inclusão na amostragem.

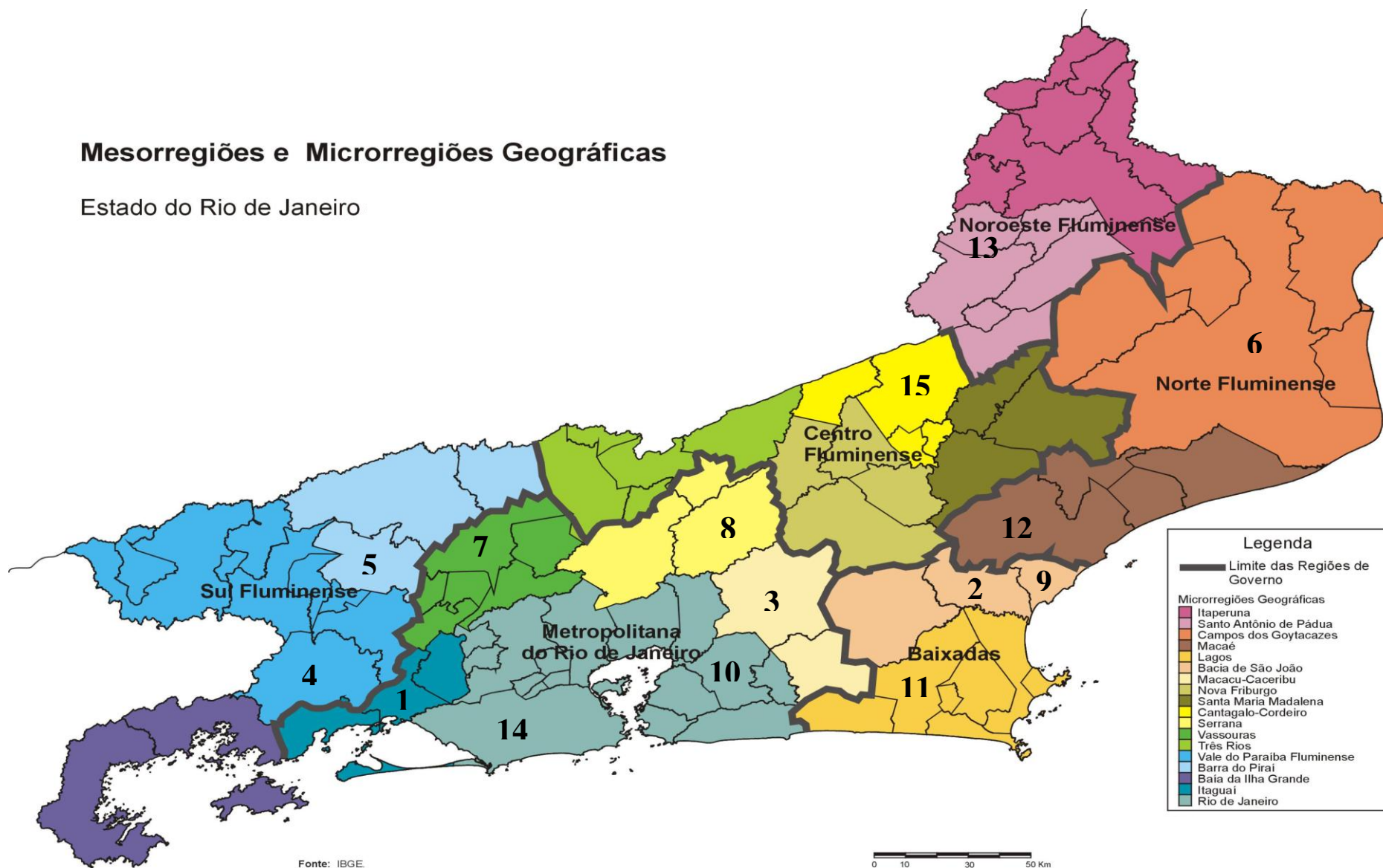
Concomitante a obtenção das amostras de soro, foi realizada uma entrevista para preenchimento de um questionário de respostas fechadas com o objetivo de obter informações sobre o rebanho e individual de cada animal, tais como: número de animais, objetivo da produção, manejo, presença de outros animais, sexo, idade, ectoparasitos, entre outras observáveis nos **Anexos D e E**.

No momento da coleta, foi também realizada inspeção visual de todos os animais com objetivo de verificar a presença de ectoparasitas. Quando facilmente observáveis e o sistema de contenção permitia a coleta, os espécimes foram removidos para posterior identificação em lupa estereoscópica segundo a chave de Barros-Battesti et al. (2006).



## Mesorregiões e Microrregiões Geográficas

Estado do Rio de Janeiro



**Figura 1** Municípios onde foram coletadas amostras biológicas de bubalinos e suas localizações dentro das micro e mesorregiões do estado do Rio de Janeiro. 1-Itaguaí, 2-Casimiro de Abreu, 3-Cachoeiras de Macacu, 4-Rio Claro, 5-Barra do Piraí, 6-Campos Goytacazes, 7-Vassouras, 8-Teresópolis, 9-Rio das Ostras, 10-Itaboraí, 11-Araruama, 12-Macaé, 13-Miracema, 14-Rio de Janeiro e 15-Cantagalo.

### 3.1.2 Obtenção do antígeno para *B. burgdorferi*

A produção do antígeno de *B. burgdorferi* foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, do Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado no prédio do Projeto Sanidade Animal (convênio UFRRJ/Embrapa), município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro.

Nesta etapa, foram utilizados o meio Barbour, Stoenner e Kelly (BSK; Sigma Chemical®), e a cepa G39/40 de *B. burgdorferi* stricto sensu de origem norte americana, gentilmente cedida pelo Professor Dr. Natalino Hajime Yoshinari do Laboratório de Síndrome Baggio-Yoshinari, Faculdade de Medicina da USP. A metodologia sugerida por Grodzicki; Steere (1988) foi seguida com modificações.

Inicialmente, foram utilizados cinco tubos de centrífuga de 15mL e seis tubos de 50mL estéreis onde foram aliquoteados 3mL e 45mL de meio BSK, respectivamente. A amostra da cepa de *B. burgdorferi* criopreservada em glicerol 80% e congelada em nitrogênio líquido foi reativada adicionando 0,5mL da amostra em 3mL de BSK e, em sequência, incubada em estufa 33°C por três dias. No terceiro dia, o cultivo foi observado em microscopia de campo escuro para avaliar a qualidade da cultura (quantidade e mobilidade das espiroquetas).

Tendo sido observada uma boa multiplicação de espiroquetas, foi realizada a lavagem do cultivo para retirada do criopreservante e para melhorar o desempenho do crescimento. Para este fim, foi repicado 0,5mL da cultura em um novo tubo com 3mL de BSK, que foi observado após terceiro dia da mesma forma anteriormente citada. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes, sendo que o último repique foi feito em dois tubos cada um com 3mL de BSK.

Na etapa seguinte, foi realizado o cultivo propriamente, retirando 1mL do último repique para cada tubo contendo 45mL de meio BSK. Os tubos foram então incubados a 33°C e, a partir do 7º dia, observados quanto à acidificação do meio pela mudança de coloração, indicando a multiplicação máxima das espiroquetas.

Todas as etapas envolvendo manipulação do meio de cultura foram realizadas em capela de fluxo laminar e os tubos vedados com parafilme.

Sequencialmente, os tubos contendo o cultivo foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 20379g, por 50 minutos a 4°C, retirado o sobrenadante e os pellets ressuspensos em tampão salino fosfatado (**Anexo A**) com 0,001M MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O pH 7,4 (PBSMg). Os pellets ressuspensos foram então reunidos em um único tubo e lavados com PBSMg por centrifugação (20379g/50 minutos/4°C) por três vezes. Após a última lavagem, o pellet foi ressuspensado em 5mL de PBSMg e submetido à sonicação (Fisher Sonic Dismembrator, modelo 300, Dynatech), por 10 minutos, fracionados em 20 ciclos de 30 segundos de sonicação (80% de potência) com 30 segundos de intervalo.

O produto resultante da sonicação foi filtrado em membrana de 0,45µm, obtendo-se assim extrato total de antígeno, o qual foi aliquoteado em tubos 0,2mL e armazenado a -20°C até o momento do uso.

A concentração proteica do antígeno foi dosada através da técnica de Folin, segundo metodologia descrita por Lowry et al. (1951).

### 3.1.3 Produção do soro hiperimune para *B. burgdorferi*

A produção do soro hiperimune bubalino para *B. burgdorferi* foi realizado no Sítio São Judas Tadeu, de propriedade do Sr. Joaquim Valente Dias, localizada no Município de

Itaguaí, RJ. Esse procedimento foi executado no período de 10 de junho de 2008 até 13 de outubro de 2008.

O controle positivo para o teste sorológico foi produzido segundo Ishikawa (1997) com modificações. Um bezerro bubalino sadio, de 36 dias de idade e 50Kg de peso vivo, foi inoculado (1mg/12Kg) com o extrato total de *B. burgdorferi* cepa G39/40 e adjuvante de Freund (Sigma Chemical<sup>®</sup>) 50% completo e 50% incompleto na proporção de 1:1 com o antígeno. Foram realizadas três inoculações subcutâneas com intervalos de 15 dias entre as mesmas. Antes da primeira aplicação do inóculo foi realizada coleta de sangue para obtenção de soro, como descrito no item 3.1.1. As coletas de sangue continuaram durante aproximadamente quatro meses (125 dias), com intervalos de cinco dias entre as mesmas, totalizando 26 amostras de soro.

O antígeno utilizado para inoculação do bezerro bubalino foi produzido conforme descrito no item 3.1.2, porém após a etapa de lavagem do cultivo com PBSMg, a suspensão foi submetida à inativação das espiroquetas por aquecimento em banho-maria a 56°C durante 30 minutos e posteriormente observada ao microscópio para certificar a inativação.

Para determinação do dia de pico de produção de anticorpos, as 26 amostras de soro foram submetidas ao ELISA indireto (Antígeno 20mg/mL; Soro 1:400; Conjugado 1:5000, Sigma Chemical<sup>®</sup>) para pesquisa de IgG, segundo Corrêa (2007).

### **3.1.4 Obtenção dos antígenos e controles positivos para os agentes da TPB**

Os antígenos parcialmente purificados de *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, produzidos conforme descreveram Madruga et al. (2000a; b) e Madruga et al. (2001), respectivamente, e o controle positivo bovino, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, Pesquisador da Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), Campo grande – MS.

### **3.1.5 Obtenção de controles negativos para *B. burgdorferi* e agentes da TPB**

Como controles negativos foram utilizados 12 soros de bubalinos gentilmente cedidos pela EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas - RS, proveniente de animais da raça Murrah, criados em área isolada do convívio com outros animais, aparentemente saudáveis e sem histórico de carrapatos. Os soros foram coletados, aliquotados e armazenados conforme descrito no item 3.1.1.

Para comprovar a negatividade das amostras para *B. burgdorferi*, os soros foram diluídos a 1:400 em PBS Tween 20 0,05% pH 7,4 e submetidos ao teste ELISA indireto segundo Corrêa (2007). Enquanto para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* os soros foram testados conforme o item 3.1.8. Nesta etapa, foram utilizados controles positivos bovinos e 12 soros de bovinos negativos (provenientes de animais de isolamento, sem contato com carrapatos e dípteros hematófagos).

Os 12 soros de búfalos negativos foram utilizados para definir o *cutoff* do ensaio, discernindo os animais positivos e negativos com nível de confiança de 99,0%, segundo metodologia descrita por Frey et al. (1998). A fórmula matemática de Frey se baseia em um fator *t* (distribuição t-Student), determinado pelo número de controles negativos e no nível de confiança desejado:

$$Cutoff = \bar{X} + SD \times t \sqrt{1+(1/n)}$$

$\bar{X}$  = média das densidades ópticas dos controles negativos.

$SD$  = desvio padrão das densidades ópticas dos controles negativos.

$t$  = valor da distribuição  $t$ , baseado em  $n$  e no de nível de confiança desejado. Tabela exibida em Frey et al. (1998)

$n$  = número de controles negativos.

Para corrigir o efeito da variação da densidade óptica (DO) obtidas com a leitura de cada placa testada, o valor de *cutoff* de cada uma das placas foi igualado a 100 (DO soro teste x 100/*cutoff*) e os resultados de cada soro teste expressos na forma de Índice de Densidade Óptica (IDO).

### 3.1.6 Validação do teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos anti-*B. burgdorferi* em búfalos

Para pesquisa de anticorpos homólogos anti-*B. burgdorferi* em búfalos se fez necessário estabelecer qual diluição de antígeno e de soro concediam maior clareza aos resultados obtidos por meio do teste ELISA indireto, padronizado para bovinos por Ishikawa et al. (1997).

Para isso, foi sensibilizada uma placa de ELISA (Costar 3590, Corning®) com três diferentes diluições de antígeno (10µg/mL; 15µg/mL; 20µg/mL), utilizadas quatro diferentes diluições de soros controles positivos e negativos (1:200; 1:400; 1:800; 1:1000) e conjugado (Sigma Chemical®) 1:5000, como mostra o esquema representado no **Quadro 1**.

Os resultados em densidades ópticas obtidos após a leitura em espectrofotômetro foram cruzados para verificar qual combinação entre diluição do antígeno e do soro fornecia maior diferença entre as densidades ópticas dos soros positivos e negativos.

**Quadro 1** Esquema da placa de ELISA utilizada para validação do teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos contra *Borrelia burgdorferi* em búfalos

Soro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Conjugado	
1 : 200	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+	1:5000	
	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-		
1 : 400	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+		
	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-		
1 : 800	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+		
	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-		
1 : 1000	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+	A+	A+	B+	B+		
	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-	C-	C-	D-	D-		
Antígeno	10µg/ml				15µg/ml				20µg/ml					

A+ e B+: soros positivos

C- e D-: soros negativos

### 3.1.7 ELISA indireto para pesquisa de anticorpos do tipo IgG anti-*B. burgdorferi* em búfalos

O teste sorológico utilizado foi o ELISA indireto padronizado por Ishikawa et al. (1997) para bovinos com as modificações obtidas no item anterior. Neste ensaio foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 orifícios (Costar 3590, Corning<sup>®</sup>) sensibilizadas com o antígeno de *B. burgdorferi* stricto sensu cepa G39/40 diluído em tampão carbonato pH 9,6 e incubadas durante 12 horas em câmara úmida a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com PBS Tween 20 a 0,05% pH 7,4 (Tw20).

A etapa de bloqueio foi realizada com gelatina a 1% em PBS Tw20 com posterior incubação por uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas novamente as três lavagens da placa.

Os 12 controles negativos, o controle positivo e os soros testes foram diluídos em PBS Tw20 e dispostos nas placas em duplicatas. As placas foram incubadas por 90 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente e, posteriormente lavadas como na etapa anterior. Então, foi disposto o conjugado IgG de coelho anti IgG bovina ligado a fosfatase alcalina (Sigma Chemical<sup>®</sup>) na diluição de 1:5000 em PBS Tw20 com mais 1 hora de incubação nas mesmas condições anteriores e seguida das lavagens das placas.

Após esta última incubação foi empregado o substrato revelador do teste para-nitrofenil-fosfato de sódio (PNPP; Sigma Chemical<sup>®</sup>) diluído em tampão glicina pH 10,5 na concentração de 1µg/mL. Em seguida as placas foram monitoradas em espectrofotômetro para microplacas de 96 orifícios (Labsystems iEMS Reader MF) sob comprimento de onda de 405nm, até que o controle positivo atingisse D.O.=1. Esta última leitura foi utilizada na avaliação do resultado do teste.

Em todas as fases do ensaio utilizou-se 200µL de solução por orifício.

As fórmulas das soluções utilizadas neste item estão expostas no **Anexo A**.

### 3.1.8 ELISA indireto para pesquisa de anticorpos do tipo IgG contra agentes da TPB em búfalos

Os testes para diagnóstico de *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* seguiram padronizações estabelecidas por Madruga et al. (2001) e Madruga et al. (2000a; b), respectivamente, com modificações.

Neste ensaio foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 orifícios (Costar 3590, Corning<sup>®</sup>) sensibilizadas com o antígeno a 5µg/mL para *A. marginale* e *B. bigemina*; e 20µg/mL para *B. bovis*. Os antígenos foram diluídos em tampão salino fosfatado Tween 20 0,1% pH 7,2 (PBST 0,1%), dispostos nas placas no volume de 100µL/poço, com posterior incubação por 12 horas a 4°C, seguida de cinco lavagens com PBST 0,1%.

A etapa de bloqueio das placas foi realizada com leite desnatado a 5% em PBST 0,1% e incubação por uma hora em estufa a 37°C (100µL/poço). Em seguida foram realizadas novamente as cinco lavagens das placas.

Os 12 controles negativos, o controle positivo e os soros testes foram diluídos na concentração de 1:800 em PBST 0,1% e dispostos em duplicatas nas placas (100µL/poço), que foram incubadas por 1 hora a 37°C e posteriormente lavadas como na etapa anterior. Então, foi adicionado o conjugado IgG de coelho anti-IgG bovina ligado a peroxidase (Sigma Chemical<sup>®</sup>) na diluição de 1:10.000 em PBST 0,1% (100µL/poço) por 30 minutos a 37°C e, em seguida, foram feitas as lavagens das placas.

Após esta última incubação foi empregado o substrato revelador do teste, ortofenil-enodiamina (Fast-OPD; Sigma Chemical<sup>®</sup>) diluído em água destilada (50µL/poço). A reação

enzimática foi parada após 10 minutos pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5N (100µL/poço). Em seguida as placas foram lidas em espectrofotômetro para microplacas de 96 orifícios (Labsystems iEMS Reader MF) sob comprimento de onda de 490nm.

Todos os testes sorológicos foram realizados no laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ e a leitura das placas de ELISA foi efetuada no Laboratório de Gramíneas da Embrapa Agrobiologia, localizada no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro.

### **3.2 Diagnóstico Molecular de *B. burgdorferi* e Agentes da TPB em Búfalos do Estado do Rio de Janeiro, por Meio da PCR.**

#### **3.2.1 Obtenção das amostras de DNA**

As amostras de sangue para obtenção de DNA foram coletadas da mesma maneira e concomitantemente com a obtenção das amostras de soro (item 3.1.1), porém foram usados tubos contendo EDTA como anticoagulante. O número total de amostras de sangue para extração de DNA foi de 295 e a sua distribuição geográfica está exposta no **Anexo C**.

Após cada coleta de sangue, estes foram aliqüotados em microtubos e armazenados a -20°C até o momento da extração do DNA.

A extração de DNA foi realizada usando kit de extração Qiagen® (DNeasy® Blood & Tissue kit), cujo protocolo de extração do fabricante foi seguido, realizando a etapa de eluição por 3 vezes consecutivas e obtendo um volume final de 300µl de cada amostra.

A concentração do DNA obtido de cada amostra foi quantificada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop®, revelando uma concentração de média de 20ng/µL com desvio padrão de 9ng/µL. A quantificação foi realizada no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, Departamento de Solos, Instituto de Agronomia da UFRRJ, com a colaboração do Professor Dr. Leandro Azevedo Santos.

#### **3.2.2 Obtenção dos controles positivos**

Como controle positivo para *B. burgdorferi*, foi utilizado DNA de *Borrelia garinii*, cuja amplificação do gene *flgE* apresenta homologia de 94% com o mesmo gene de *Borrelia burgdorferi* (GenBank L43849), evitando dúvidas quanto à contaminação de amostras.

O controle positivo para *A. marginale* foi proveniente de um bubalino do município de Araruama positivo em esfregaço sanguíneo, produzido com sangue total obtido por venopunção jugular.

Para *B. bigemina* e *B. bovis*, os controles positivos foram produzidos por inoculação de bezerros bovinos e foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG.

#### **3.2.3 PCR para *B. burgdorferi***

Para realização da PCR para *B. burgdorferi* foram inicialmente selecionadas 12 amostras de DNA de animais com reatividade alta ao ELISA indireto realizado no item 3.1.7. Estas amostras foram submetidas à técnica de *nested* PCR padronizada por Mantovani (2010).

Os dois pares de iniciadores utilizados foram desenhados por Mantovani et al. (dados não publicados) para amplificação do gene *flgE* (SAL et al., 2008) e possuem as sequências descritas a seguir.

Primeira reação (PCR):

*flgE* 513pb forward 5´- TTGGTGTCTTCTGAGCTTAGAGTTG -3´ (posição 755 a 778)  
*flgE* 513pb reverse 5´- CGCCTATTCTAACTTGACCTGAAT -3´ (posição 1244 a 1267)

Segunda reação (nPCR):

*flgE* 262pb forward 5´- TTGGGTGCAAATGTAGGTGA -3´ (posição 946 a 965)  
*flgE* 262pb reverse 5´- CAAGTCCTCCGGGATTCATA -3´ (posição 1188 a 1207)

No mix da primeira reação os iniciadores foram utilizados na concentração de 0,2µM; 10mM de tampão Tris-HCl; 1,5mM de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>); 1,25mM de dNTPs; 1,5U de Taq DNA Polimerase e 5µL de DNA. Todos os reagentes foram diluídos em água ultrapura, obtendo-se um volume final de 50µL.

Na segunda reação (nPCR) foram utilizados 1µL do produto da primeira reação e as mesmas concentrações de todos os reagentes citados acima, em um volume final de 50µL de mix.

Em ambas as reações a temperatura de desnaturação inicial foi de 95°C/3min; 40 ciclos de desnaturação a 95°C/45seg, anelamento a 64°C/45seg e extensão a 72°C/45seg; e extensão final a 72°C/7min.

Todos os reagentes utilizados nestas reações foram produzidos pela Invitrogen®.

Para todas as reações, foi utilizado um controle positivo (DNA *B. garinii*) e um controle negativo (mix puro). O produto final das reações foi analisado em gel de agarose, corado por SYBr Gold (Invitrogen®) e visualizado à transiluminação por luz ultravioleta.

A técnica de PCR para diagnóstico molecular de *B. burgdorferi* foi realizada pelo Laboratório de Síndrome Baggio-Yoshinari da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo – SP, com a colaboração do Dr. Natalino Hajime Yoshinari e da Dra. Elenice Mantovani.

### 3.2.4 Adaptação da PCR para *B. bigemina* e *B. bovis*

Para *B. bigemina* e *B. bovis*, foi igualmente feito um teste inicial para determinar a sensibilidade das técnicas para cada agente (item 3.2.8), usando a reação padronizada por Linhares et al. (2002) para ambos os agentes. Posteriormente, foram testadas diferentes temperaturas de anelamento: 55, 56, 57, 58, 59 e 60 graus Célsius; concentrações de MgCl<sub>2</sub>: 1,5mM, 1,75mM, 2,0mM e 2,5mM; e concentrações de iniciadores: 0,12µM, 0,16µM, 0,2µM, 0,28µM, 0,4µM e 0,6µM. Também foi comparado, para *B. bigemina*, o número de ciclos da reação de PCR, sendo testado: 30, 35 e 40 vezes. Após os resultados das análises, foram refeitos os testes de sensibilidade da técnica para ambos os agentes.

### 3.2.5 Adaptação da PCR para *A. marginale*

Nesta etapa, foi feito um teste inicial para determinar a sensibilidade da técnica (item 3.2.8) seguindo estritamente o trabalho de Torioni de Echaide et al. (1998). Posteriormente, com o objetivo de aperfeiçoar a reação dentro da realidade existente (equipamentos, reagentes, etc.), foram testadas diferentes temperaturas de anelamento: 63, 64, 65, 66, 67 e 68 graus Célsius; concentrações de MgCl<sub>2</sub>: 1,5mM, 1,75mM, 2,0mM, 2,5mM; e concentrações de iniciadores: 0,2μM, 0,3μM, 0,4μM, 0,6μM e 0,8μM. Por fim, foi novamente executado o teste de sensibilidade da técnica para observar se houve alterações devido às modificações realizadas.

### 3.2.6 PCR para *B. bigemina* e *B. bovis*

O diagnóstico molecular de *B. bigemina* e *B. bovis* foi realizado por meio da técnica de PCR padronizada por Linhares et al. (2002), com modificações. Os dois pares de iniciadores selecionados foram desenhados para identificar o gene *18SrRNA* de *B. bigemina* (GenBank nº X59604) e *B. bovis* (GenBank nº U06105) e possuem as sequências abaixo.

*Babesia bigemina*:

GAU7 forward 5'- GTTGGGTCTTTTCGCTGGC -3' (*18SrRNA* posição 848 a 866)  
GAU6 reverse 5'- CCACGCTTGAAGCACAGGA -3' (*18SrRNA* posição 1532 a 1515)

*Babesia bovis*:

GAU9 forward 5'- CTGTCGTACCGTTGGTTGAC -3' (*18SrRNA* posição 675 a 694)  
GAU10 reverse 5'- CGCACGGACGGAGACCGA -3' (*18SrRNA* posição 1215 a 1198)

No mix da reação de PCR para estes agentes foram utilizadas as concentrações de iniciadores (Invitrogen<sup>®</sup>), MgCl<sub>2</sub> (Ludwig Biotec<sup>®</sup>) e Taq DNA Polimerase (Ludwig Biotec<sup>®</sup>) determinadas no item 3.2.4. 10mM de tampão Tris-HCl (Ludwig Biotec<sup>®</sup>), 0,2mM de dNTPs (Ludwig Biotec<sup>®</sup>) e 5μL de DNA em um mix com 25μL de volume final.

As reações foram processadas em termociclador (Eppendorf Mastercycle Gradiente<sup>®</sup>) sob as seguintes condições:

*Babesia bigemina*: 94°C/5min para desnaturação inicial; 40 ciclos de desnaturação a 94°C/30seg, anelamento à temperatura determinada no item 3.2.4 por 30seg e extensão a 72°C/30seg; e extensão final a 72°C/5min.

*Babesia bovis*: 94°C/5min para desnaturação inicial; 40 ciclos de desnaturação a 94°C/30seg, anelamento à temperatura determinada no item 3.2.4 por 30seg e extensão a 72°C/1min; e extensão final a 72°C/5min.

Para todas as reações, foi utilizado um controle positivo e um controle negativo (mix puro). Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE, com padrão de massa molecular Ladder 1Kb (Ludwig Biotec<sup>®</sup>). Posteriormente, foram corados com brometo de etídio (0,4μg/mL; Invitrogen<sup>®</sup>) e visualizados sob transiluminador UV (BioRad<sup>®</sup>).

Para iniciar a PCR para ambos os agentes foi estabelecido um critério de prioridade. Primeiramente foram testadas pela PCR 36 amostras com maiores D.O. ao ELISA indireto e 36 amostras negativas. O resultado deste teste inicial determinou o prosseguimento ou não das análises.



### 3.2.7 PCR para *A. marginale*

As amostras de DNA obtidas para diagnóstico molecular de *A. marginale* foram analisadas por meio da técnica de PCR padronizada por Torioni de Echaide et al. (1998), com modificações. Os iniciadores selecionados foram desenhados para identificar o gene que codifica a proteína principal de superfície 5 (*msp5*), de acordo com a cepa de *A. marginale* Florida (GenBank nº M93392) e possuem a sequência abaixo:

Externo forward 5'- GCATAGCCTCCGCGTCTTTC -3' (*msp5* posição 254 a 273)

Externo reverse 5'- TCCTCGCCTTGCCCCTCAGA -3' (*msp5* posição 710 a 692)

No mix da reação de PCR para *A. marginale* foram utilizadas as concentrações de iniciadores (Invitrogen<sup>®</sup>), MgCl<sub>2</sub> (Ludwig Biotec<sup>®</sup>) e Taq DNA Polimerase (Ludwig Biotec<sup>®</sup>) determinadas no item 3.2.5. 10mM de tampão Tris-HCl (Ludwig Biotec<sup>®</sup>), 0,2mM de dNTPs (Ludwig Biotec<sup>®</sup>) e 5µL de DNA em um mix com 25µL de volume final.

A reação foi processada em termociclador (Eppendorf Mastercycle Gradiente<sup>®</sup>) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C/3min; 35 ciclos de desnaturação a 95°C/30seg, anelamento à temperatura determinada no item 3.2.5 por 58seg e extensão a 72°C/30seg; e extensão final a 72°C/10min.

Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,3% em tampão TAE, com padrão de massa molecular Ladder 100pb (Ludwig Biotec<sup>®</sup>). Posteriormente, foram corados com brometo de etídio (0,4µg/mL; Invitrogen<sup>®</sup>) e visualizados sob transiluminador UV (BioRad<sup>®</sup>).

### 3.2.8 Determinação da sensibilidade das reações de PCR para agentes da TPB

A sensibilidade da reação para *A. marginale* e *B. bigemina* e *B. bovis* foi avaliada por meio de diluições seriadas de um DNA positivo de animal com parasitemia conhecida. Com este objetivo, foi feito o cálculo da parasitemia em lâmina (IICA, 1987) e hematimetria de um animal positivo para cada agente. Desta forma, foram feitos esfregaços sanguíneos em lâmina, com sangue obtido por punção da jugular, e contagem do número de hemácias em câmara de Neubauer. A lâmina foi levada ao microscópio óptico e três campos foram fotografados para fazer uma média do número de hemácias por campo. Posteriormente, foi determinando o percentual de parasitemia por meio da contagem dos parasitos por campo, somando aproximadamente 20.000 hemácias. Considerando o resultado da hematimetria, foi obtida uma estimativa do número de parasitos por microlitro de sangue.

Após obtenção do valor da parasitemia e considerando o volume de sangue utilizado para extração de DNA (100µL; Qiagen<sup>®</sup>); o volume de DNA que foi obtido ao final da extração (300µL); e o volume de DNA usado para fazer a reação de sensibilidade da PCR (1µL), foi estimada a capacidade de detecção da técnica por meio de diluições seriadas (1:10) do DNA positivo em água ultrapura.

Todas as reações de PCR para os agentes da TPB foram realizadas no laboratório de Biologia Molecular do Curso de Pós-graduação em Ciência Veterinária, IV, UFRRJ, campus Seropédica.

### 3.3 Sequenciamento

O sequenciamento do fragmento do gene *flgE* de *B. burgdorferi* amplificado de sangue bubalino foi realizado com a colaboração do Dr. Natalino Hajime Yoshinari e da Dra. Elenice Mantovani, do Laboratório de SBY da USP, São Paulo – SP. Foi utilizado o QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH) para purificação e o sequenciamento (SANGER et al., 1977) foi realizado com o BigDye Terminator Cycle Sequencing kit, version 3.1 (Applied Biosystems). A análise da sequência foi realizada pelo ABI Prism 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram submetidas ao *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST - NCBI) (ALTSCHUL et al., 1990).

### 3.4 Análise Estatística

As frequências de animais positivos no ELISA indireto e na PCR para *B. burgdorferi*, *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* foram comparadas por meio do teste Exato de Fisher e Qui-quadrado, com 95% de confiança. A mesma análise foi feita com a frequência de positivos em relação às informações obtidas com as entrevistas para preenchimento dos questionários.

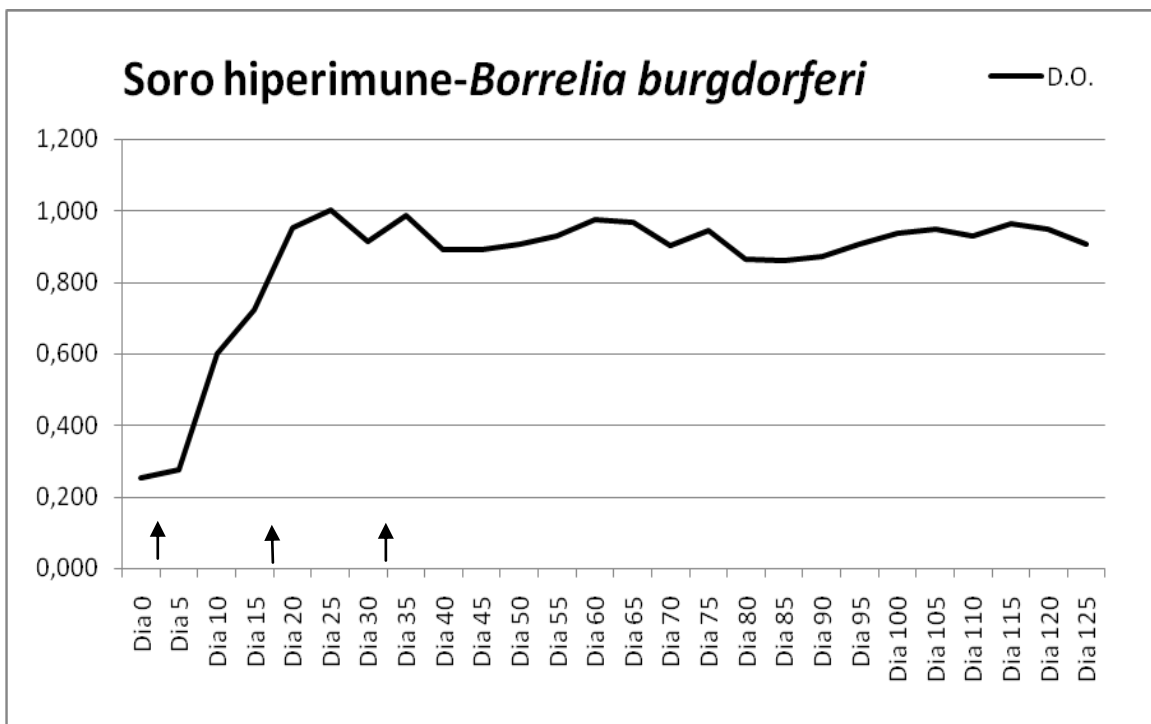
Nas análises dos índices de densidades ópticas foi utilizada a comparação de médias por meio dos testes Anova, Fisher e Kruskal Wallis, com 95% de confiança.

Os cálculos foram realizados por meio do programa computacional BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Produção do Soro Hiperimune para *B. burgdorferi*

A metodologia empregada para produção do controle positivo para *B. burgdorferi* se mostrou satisfatória, obtendo-se pico máximo de produção de anticorpos do tipo IgG por volta do quinto dia após a segunda inoculação (**Figura 2**).



**Figura 2** Produção de IgG anti-*Borrelia burgdorferi* em bezerro búfalo (*Bubalus bubalis*) inoculado com a cepa G39/40 de *B. burgdorferi*. As setas assinalam o momento das inoculações.

Como pode ser observado na figura acima, o inóculo de *B. burgdorferi* cepa G39/40 com adjuvante induziu a rápida resposta imune do animal obtendo-se o pico da produção de anticorpos a partir da segunda inoculação. O prolongamento das coletas de sangue foi realizado com o propósito de verificar o ritmo da produção de anticorpos do início até o seu declínio, o que não foi possível devido à manutenção da resposta imune do animal ao agente, que permaneceu alta e próxima ao pico máximo até o final das coletas de amostras. Ishikawa (1997) e Guedes Jr (2006), em estudos semelhantes com bovinos, obtiveram pico da produção de anticorpos contra *B. burgdorferi* no 9° e 15° dias após o terceiro inóculo, respectivamente. Nestes dois estudos, provavelmente por não ter sido usado adjuvante junto com o inóculo, foi observado o declínio gradativo da produção de IgG. No presente trabalho, o uso do adjuvante foi necessário para assegurar a produção do soro controle positivo por um animal sabidamente rústico, como são os bubalinos.

## 4.2 Modificações do Teste ELISA Indireto para *B. burgdorferi*

A concentração de antígeno que forneceu melhores resultados foi de 20µg/mL, diferindo do padrão estabelecido para bovinos (15µg/mL) segundo Ishikawa et al. (1997). As diluições de soro e conjugado de 1:1000 e 1:5000 respectivamente, em conjunto com a melhor concentração de antígeno encontrada forneceram uma maior diferença (5,5 vezes) entre as densidades ópticas observadas nos soros positivos e negativos e foram usadas como padrão neste trabalho.

## 4.3 Frequência de Anticorpos Homólogos do tipo IgG Contra *B. burgdorferi*, *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.

As frequências de búfalos soropositivos para os quatro agentes, assim como a análise por mesorregião estudada, estão expostos na **Tabela 1**. O ELISA indireto revelou que no total das 316 amostras de soro bubalino testadas, 187 (59,2%) possuíam imunoglobulinas da classe G anti-*B. burgdorferi*. Da mesma forma, foram reagentes positivos ao teste sorológico 162 (51,3%) animais para *B. bovis*, 145 (45,9%) para *B. bigemina* e 136 (43,0%) para *A. marginale*.

**Tabela 1** Frequência de anticorpos homólogos do tipo IgG contra *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, detectados por meio do ELISA indireto em soros de búfalos (*Bubalus bubalis*), colhidos entre 06/2008 e 12/2009 e estratificados por mesorregião do estado do Rio de Janeiro.

Mesorregiões	<i>B. burgdorferi</i>			<i>B. bovis</i>		<i>B. bigemina</i>		<i>A. marginale</i>	
	N	+	%	+	%	+	%	+	%
<b>Centro Fluminense</b>	9	8	88,9 <sup>a</sup>	9	100,0 <sup>a</sup>	7	77,8 <sup>a</sup>	9	100,0 <sup>a</sup>
<b>Noroeste Fluminense</b>	14	12	85,7 <sup>a</sup>	10	71,4 <sup>a</sup>	10	71,4 <sup>a</sup>	9	64,3 <sup>ab</sup>
<b>Baixadas Litorâneas</b>	102	69	67,6 <sup>a</sup>	32	31,4 <sup>b</sup>	55	53,9 <sup>a</sup>	42	41,2 <sup>b</sup>
<b>Norte Fluminense</b>	45	26	57,8 <sup>a</sup>	18	40,0 <sup>bc</sup>	12	26,7 <sup>b</sup>	14	31,1 <sup>b</sup>
<b>Metropolitana do RJ</b>	93	47	50,5 <sup>b</sup>	61	65,6 <sup>ac</sup>	45	48,4 <sup>a</sup>	43	46,2 <sup>b</sup>
<b>Sul Fluminense</b>	53	25	47,2 <sup>b</sup>	32	60,4 <sup>c</sup>	16	30,2 <sup>b</sup>	19	35,8 <sup>b</sup>
<b>Total*</b>	<b>316</b>	<b>187</b>	<b>59,2<sup>A</sup></b>	<b>162</b>	<b>51,3<sup>AB</sup></b>	<b>145</b>	<b>45,9<sup>BC</sup></b>	<b>136</b>	<b>43,0<sup>C</sup></b>

N: número de amostras de soro analisadas por meio do ELISA indireto.

+: número de amostras positivas.

Colunas com valores seguidos por letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste Exato de Fisher a 5% de significância.

\*Linha com valores seguidos por letras maiúsculas iguais não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância.

A análise dos resultados demonstrou que as mesorregiões Centro e Noroeste Fluminense apresentaram as maiores frequências de animais soropositivos para os quatro agentes estudados. No entanto, para *B. burgdorferi*, as mesorregiões Centro, Noroeste e Norte Fluminenses e Baixadas Litorâneas apresentaram frequências de positivos que não diferiram estatisticamente entre si ( $p>0,05$ ). As mesorregiões Metropolitana e Sul Fluminense apresentaram frequências de positivos estatisticamente mais baixas que as demais ( $p<0,05$ ), provavelmente devido às características climáticas e o manejo empregado nas propriedades situadas nessas duas regiões.

A frequência de anticorpos contra *B. burgdorferi* foi a mais alta entre todos os agentes analisados neste estudo, embora não tenha diferido estatisticamente do percentual de positivos para *B. bovis*. Alguns fatores epidemiológicos podem estar relacionados com o resultado obtido para este agente, como por exemplo, o contato com outros animais domésticos e animais silvestres.

Todas as propriedades visitadas mantinham contato dos búfalos com algum outro animal doméstico, com a única exceção da propriedade situada no município de Macacu-Caceribu. O contato entre bubalinos e equinos foi observado em 94,4% das propriedades, em 77,7% havia contato dos búfalos com bovinos e em 83,3% com caninos. Estas observações podem ter relevante importância, pois outros estudos realizados no estado do Rio de Janeiro relatam presença de anticorpos contra *B. burgdorferi* nestes animais.

Soares et al. (1999) observaram 20,0% dos cães da Baixada Fluminense reagentes positivos para *B. burgdorferi*, assim como 42,9% e 28,1% dos equinos de diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro, segundo Salles et al. (2002) e Madureira (2004) respectivamente. Em bovinos, Ishikawa (1996) observou 63,8% (240/376) de positivos, o que corrobora o resultado deste estudo com bubalinos, sugerindo não haver diferença entre a frequência de positivos de ambas as espécies. Estes trabalhos demonstraram que o agente estudado está presente circulando entre diferentes populações de animais domésticos.

Além dos animais domésticos, animais silvestres também podem fazer parte do ciclo de manutenção de *Borrelia* sp. em determinados ecossistemas (ABEL et al., 2000; BARROS-BATTESTI et al., 2000). No presente trabalho foram obtidas, por meio do questionário realizado, informações sobre a existência de contato de animais silvestres com os bubalinos e a existência de mata ao redor da propriedade. Esses dados revelaram que em 100% das propriedades havia proximidade com matas e algum tipo de contato com animais silvestres, principalmente, pequenos roedores, gambás e capivaras.

A possibilidade de reação cruzada com outras espécies de *Borrelia* sp., principalmente *B. theileri* (ROGERS et al., 1999), e outras espécies de espiroquetas, em especial com *Treponema* sp. (MAGNARELLI et al., 1987; 1990), não podem ser descartadas. Este evento também poderia elevar o percentual de animais sororreagentes ao ELISA utilizando antígeno total de *B. burgdorferi*, embora, nestas condições, a maioria dos registros de reações cruzadas relate pouca significância (MAGNARELLI; ANDERSON, 1998, ROGERS et al., 1999).

A análise dos resultados sorológicos para os agentes da TPB revelou que as mesorregiões Centro Fluminense, Noroeste Fluminense e Metropolitana do Rio de Janeiro foram as que apresentaram as maiores frequências de animais positivos para *B. bovis*. O mesmo foi observado para *B. bigemina*, com adição da mesorregião Baixadas Litorâneas, que não apresentou diferença estatística em relação às outras três citadas ( $p>0,05$ ). Para *A. marginale*, as mesorregiões Centro e Noroeste Fluminense apresentaram os maiores percentuais de animais positivos, embora a mesorregião Noroeste Fluminense não tenha sido estatisticamente diferente de todas as demais ( $p>0,05$ ).

Entre os três agentes da TPB, foi observada maior frequência de soropositivos para *B. bovis* (51,3%), seguido por *B. bigemina* (45,9%) e *A. marginale* (43,0%). Resultado que corrobora Gomes (2007), que ao acompanhar bezerros bubalinos e suas mães durante um ano

no estado do Mato Grosso do Sul, observou que a imunidade para *Babesia* sp. nesses animais é mais duradora e constante do que para *A. marginale*, principalmente em relação a *B. bovis*.

Observações anteriores realizadas em estudos com bovinos relataram maior duração da imunidade passiva e da adquirida contra *B. bovis* em relação a *B. bigemina* (JAMES et al., 1985; WRIGHT et al., 1990). Contudo, no presente estudo, não foi observada diferença estatística significativa entre as frequências de soropositivos para ambos os agentes, embora a frequência para *B. bovis* tenha sido maior.

Não foram encontrados estudos soroepidemiológicos sobre agentes da TPB em bubalinos no Brasil. Apenas um trabalho realizado em 1994 no estado de São Paulo, conforme revisado por Gomes (2007), que relata soroprevalência de 49,4% dos bubalinos de um rebanho de 500 animais, positivos para *Babesia* sp. por meio da RIFI. Resultado esse, semelhante ao encontrado no presente trabalho.

Já em estudo realizado na Argentina, foi observado apenas 20,4% de 103 bubalinos, positivos para *B. bovis* (FERRERI et al., 2008). Esse percentual mais baixo do que o observado neste estudo está provavelmente relacionado ao clima argentino, menos propício ao desenvolvimento do carrapato. Por outro lado, o uso de um ELISA competitivo, que emprega anticorpos monoclonais específicos para o antígeno de superfície MAS-2c de *B. bovis*, pode ter diminuído a sensibilidade do teste.

Assim como mostram os resultados do presente trabalho, estudos sobre *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* em bubalinos relataram frequências abaixo dos 75%, ou seja, abaixo do limiar da estabilidade enzoótica (MAHONEY; HOSS, 1972, GONÇALVES, 2000). Contudo, tanto em estudos transversais (FERRERI et al., 2008) quanto em estudos em que há um acompanhamento do rebanho (COSTA et al., 1997; GOMES, 2007), não têm sido observados casos clínicos relacionados aos agentes da TPB em búfalos. Estes fatos sugerem que a teoria da estabilidade enzoótica para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* não pode ser aplicada em rebanho bubalino como é para o rebanho bovino. Búfalos devem possuir outras formas eficientes de impedir o desenvolvimento de doença após a infecção pelos agentes da TPB que não a produção de anticorpos, pois, embora menos soroprotetidos do que os bovinos, raramente apresentam esta doença de forma clínica.

A menor frequência de búfalos soropositivos em relação aos bovinos pode ser explicada pela maior resistência dos bubalinos, que possuem origem indiana, à infestação por carrapatos. Da mesma forma, as raças bovinas inclusas na espécie *Bos indicus* são citadas como sendo as de maior resistência a *R. microplus* (SARTOR et al., 1992; BOOK et al., 1999; JONSSON, 2006) e assim possuem menor taxa de infecção por agentes da TPB.

A análise das frequências de animais soropositivos para os quatro agentes em relação ao sexo dos animais demonstrou não haver diferença estatística entre machos e fêmeas ( $p > 0,05$ ), como mostra a **Tabela 2**. O mesmo foi observado por Soares et al. (2000b) e Souza et al. (2000b) ao verificarem a frequência de *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente, em rebanhos bovinos da mesorregião Norte Fluminense, RJ.

No entanto, não foram encontrados estudos que avaliassem a intensidade da resposta imune em ambos os sexos. No presente trabalho, como mostram os gráficos de dispersão nas **Figuras 3, 5 e 6**, foi constatada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as médias dos IDOs de machos e fêmeas para *B. burgdorferi*, *B. bigemina* e *A. marginale*, respectivamente. Este resultado pode significar maior capacidade das fêmeas para produzir altas concentrações de anticorpos, gerando respostas mais intensas contra estes três agentes, fato não observado nos resultados para *B. bovis* (**Figura 4**).

Os gráficos de dispersão demonstram a intensidade da resposta imune de cada animal baseadas em seus índices de densidade ópticas. Quanto mais alto o IDO, maior a intensidade de resposta do animal. A linha contínua determina o *cutoff* do ensaio, sendo que os pontos

acima representam os animais sorologicamente positivos e os pontos abaixo da linha representam os animais soronegativos.

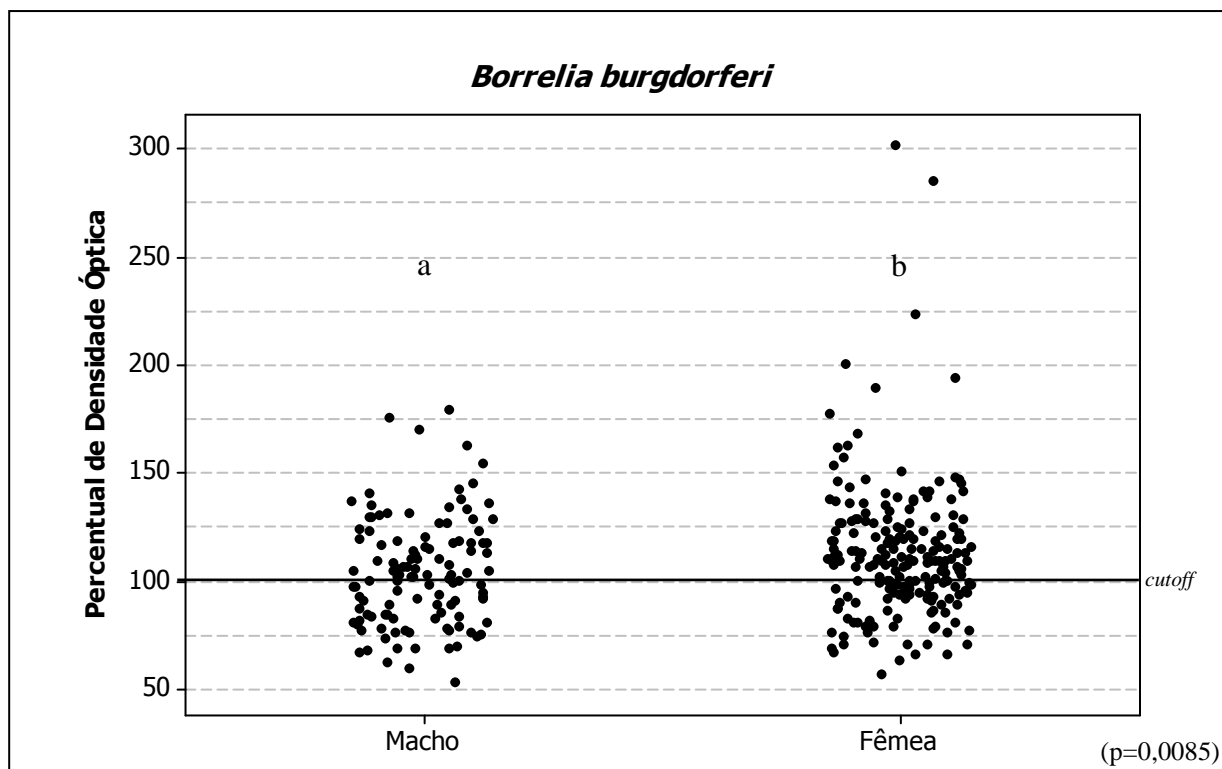
**Tabela 2** Frequência de anticorpos homólogos do tipo IgG contra *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* detectados, por meio do ELISA indireto, em soros de búfalos (*Bubalus bubalis*) do estado do Rio de Janeiro, colhidos entre 06/2008 e 12/2009 e estratificados de acordo com o sexo dos animais.

Agente etiológico	Machos (N=116)		Fêmeas (N=200)	
	+	%	+	%
<i>Borrelia burgdorferi</i>	61	52,6 <sup>a</sup>	126	63,0 <sup>a</sup>
<i>Babesia bovis</i>	62	53,4 <sup>a</sup>	100	50,0 <sup>a</sup>
<i>Babesia bigemina</i>	46	39,7 <sup>a</sup>	99	49,5 <sup>a</sup>
<i>Anaplasma marginale</i>	45	38,8 <sup>a</sup>	91	45,5 <sup>a</sup>

N: número de amostras de soro analisadas por meio do ELISA indireto.

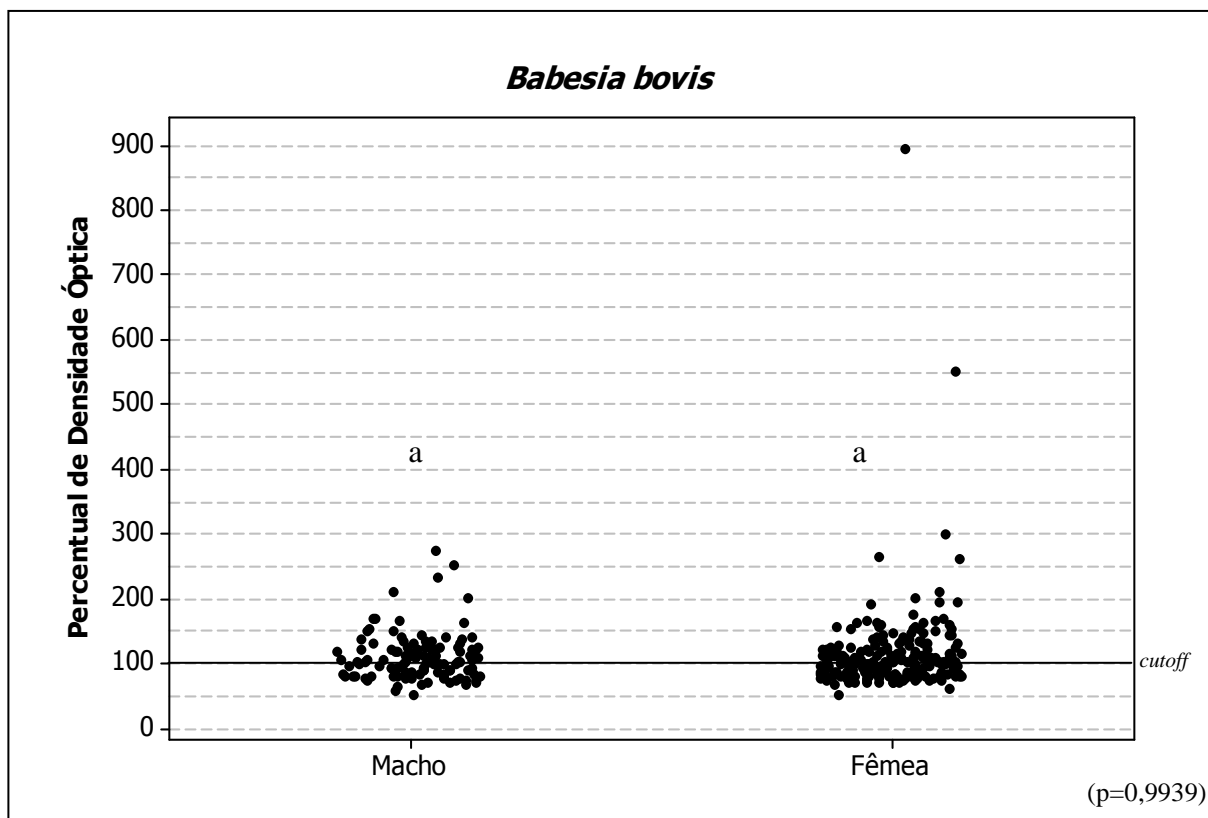
+: número de amostras positivas.

Linhas com valores seguidos por letras iguais não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância.

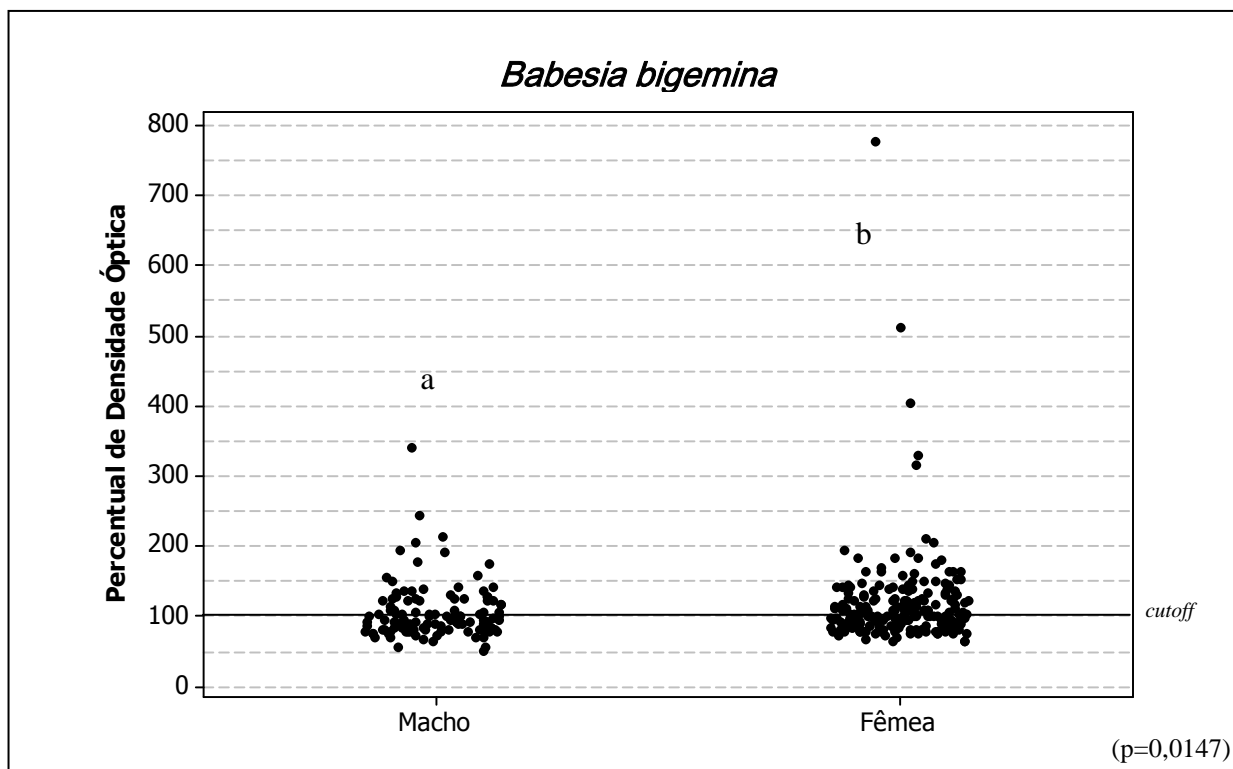


**Figura 3** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/*cutoff*) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Borrelia burgdorferi* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação ao sexo. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelos testes ANOVA e Tukey com 95% de confiança.

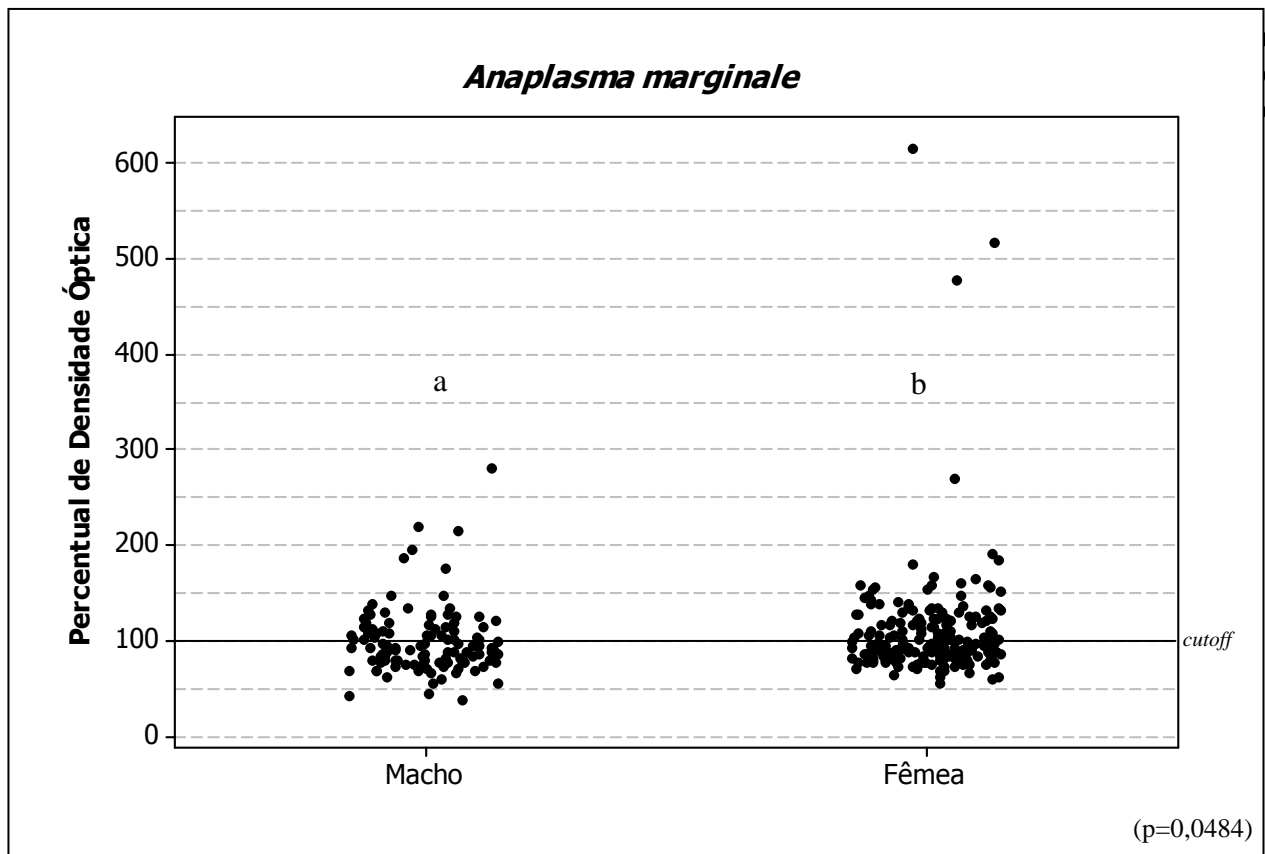




**Figura 4** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/cutoff) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Babesia bovis* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação ao sexo. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras iguais indicam não haver diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelo teste de Kruskal Wallis com 95% de confiança.



**Figura 5** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/*cutoff*) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação ao sexo. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelo teste de Kruskal Wallis com 95% de confiança.



**Figura 6** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/cutoff) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Anaplasma marginale* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação ao sexo. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelo teste de Kruskal Wallis com 95% de confiança.

A faixa etária do animal demonstrou influência sobre o número de soropositivos detectado para os quatro agentes estudados (**Tabela 3**). Bubalinos na faixa etária de 0 a 6 meses apresentaram a menor frequência de soropositividade para *B. burgdorferi*, *B. bigemina* e *B. bovis* ( $p < 0,05$ ), provavelmente relacionada à presença de anticorpos colostrais. Para *A. marginale* não houve diferença significativa entre as frequências observadas nas faixas etárias de 0 a 6 meses e de 7 a 12 meses ( $p > 0,05$ ). Assim, sugere-se que bubalinos com menos de um ano de idade sejam menos soroprotégidos contra *A. marginale*.

Foi observado um aumento progressivo do número de positivos para *B. burgdorferi* até a faixa etária de 12 a 36, porém para *B. bigemina* e *B. bovis* não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre as frequências de 7 a 12 meses e 13 a 36 meses. Da mesma forma, Souza et al. (2000b) observaram influência da idade na frequência de bovinos positivos para *B. bigemina*, uma vez que animais entre 1 e 3 anos apresentaram-se mais soroprotégidos. No entanto, o mesmo não foi observado para *B. bovis* (SOARES et al., 2000b).

Em animais com mais de 36 meses a frequência de positivos para *B. burgdorferi* não diferiu estatisticamente da faixa etária de 13 a 36 meses ( $p > 0,05$ ), mantendo-se estável. Diferentemente, para os agentes da TPB foi constatada regressão na frequência de positivos em animais com mais de 36 meses, o que pode significar uma menor duração da resposta imune humoral ou uma menor taxa de reinfecção, quando comparado com *B. burgdorferi*. Este resultado para os agentes da TPB corrobora Mahoney; Ross (1972) que observaram um acentuado declínio na produção de anticorpos contra *Babesia* sp. em bovinos após os dois anos de idade.

Costa et al. (1997) também observaram, por meio da RIFI, baixa frequência de positivos em um rebanho de 20 bezerros bubalinos ao acompanhá-los do nascimento até um ano de idade. Foi observado apenas três positivos para *Babesia* sp., cuja imunidade durou no máximo até os 30 dias de idade. Em estudo semelhante, Gomes (2007) observou, por meio do ELISA, um aumento na concentração de anticorpos contra *Babesia* sp. 24 horas após o parto, porém sem ultrapassar o limiar de positividade (*cutoff*), até os bubalinos completarem um ano de idade. Para *A. marginale* o resultado foi semelhante até os 105 dias de idade, quando os animais se tornaram positivos ao teste ELISA, provavelmente devido à infecção natural pelo agente. Desta forma, acredita-se que a quantidade de anticorpos passada da búfala para o filhote ocorra em baixas concentrações, dificilmente detectáveis em testes sorológicos (GOMES et al., 2008).

A intensidade da resposta imune para *B. burgdorferi* e agentes da TPB também foi avaliada (**Figuras 7, 8, 9 e 10**). Observou-se maior intensidade de resposta imune aos quatro agentes a partir de faixa etária de 7 a 12 meses, o que pode indicar início da primoinfecção e desenvolvimento da imunidade ativa. Observação semelhante à realizada por Costa et al. (1997), que constatou aquisição de imunidade ativa contra *B. bigemina* em búfalo com um ano de idade. Em bovinos, Mahoney; Ross (1972) também observaram que a maior taxa de infecção por *Babesia* sp. ocorre entre animais com 6 meses a 2 anos de idade. Da mesma forma, Osaki et al. (2002) constataram que 50% dos bovinos de um rebanho com alta taxa de infecção por *B. bovis* não haviam se infectado com este agente até os seis meses de idade.

Para *Borrelia* sp. em ruminantes, não foram encontradas informações a este respeito.

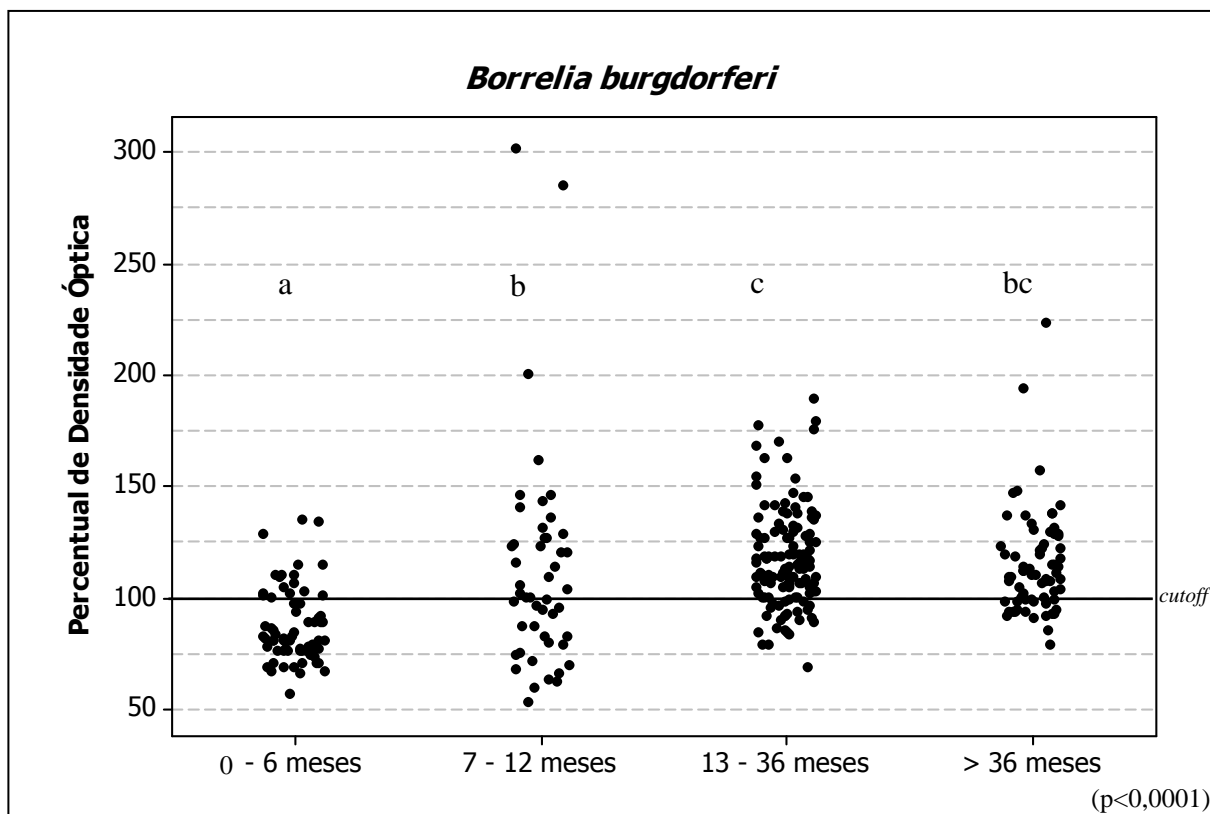
**Tabela 3** Frequência de anticorpos homólogos do tipo IgG contra *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, detectados por meio do ELISA indireto em soros de búfalos (*Bubalus bubalis*) do estado do Rio de Janeiro, colhidos entre 06/2008 e 12/2009 e estratificados de acordo com a faixa etária dos animais.

Agente Etiológico	0 - 6 meses (N=69)		7 - 12 meses (N=48)		13 - 36 meses (N=129)		> 36meses (N=70)	
	+	%	+	%	+	%	+	%
<i>Borrelia burgdorferi</i>	16	23,2 <sup>a</sup>	24	50,0 <sup>b</sup>	98	76,0 <sup>c</sup>	49	70,0 <sup>c</sup>
<i>Babesia bovis</i>	17	24,6 <sup>a</sup>	25	52,1 <sup>bc</sup>	87	67,4 <sup>b</sup>	33	47,1 <sup>c</sup>
<i>Babesia bigemina</i>	6	8,7 <sup>a</sup>	20	41,7 <sup>b</sup>	85	65,9 <sup>c</sup>	34	48,6 <sup>b</sup>
<i>Anaplasma marginale</i>	12	17,4 <sup>a</sup>	16	33,3 <sup>ac</sup>	83	64,3 <sup>b</sup>	25	35,7 <sup>c</sup>

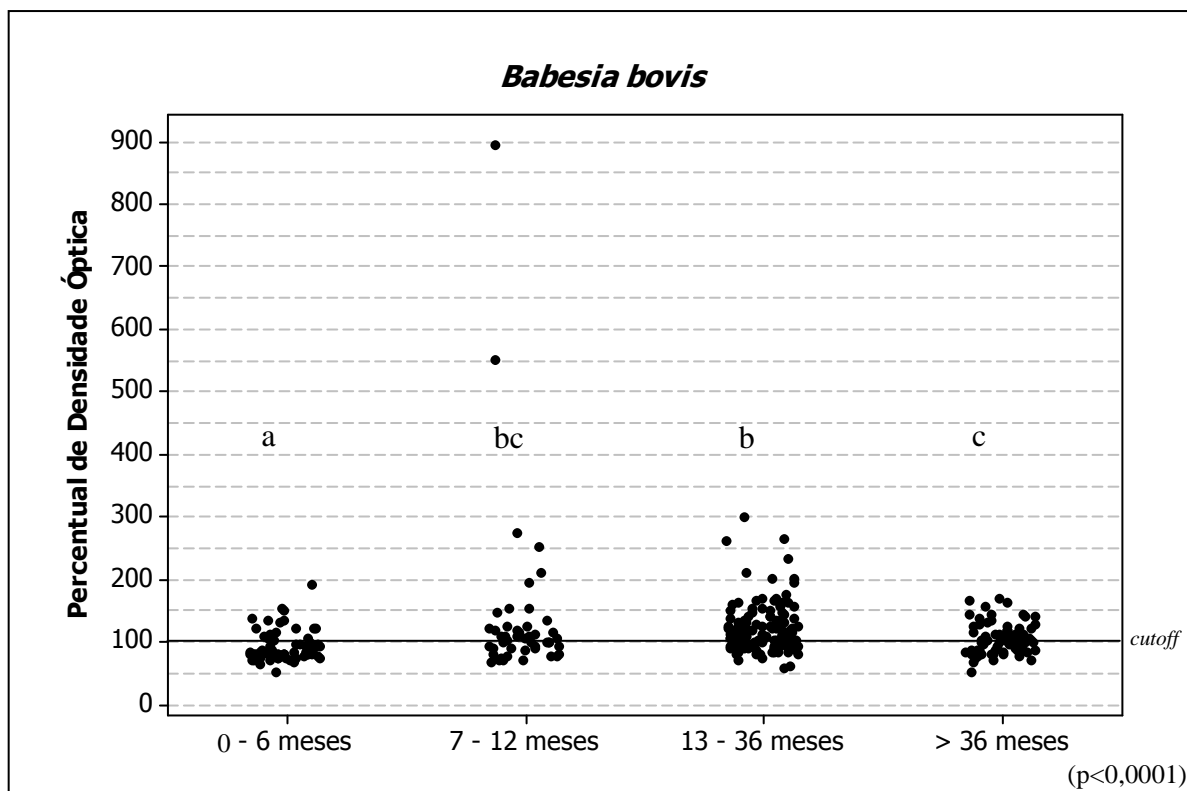
N: número de amostras de soro analisadas por meio do ELISA indireto.

+: número de amostras positivas.

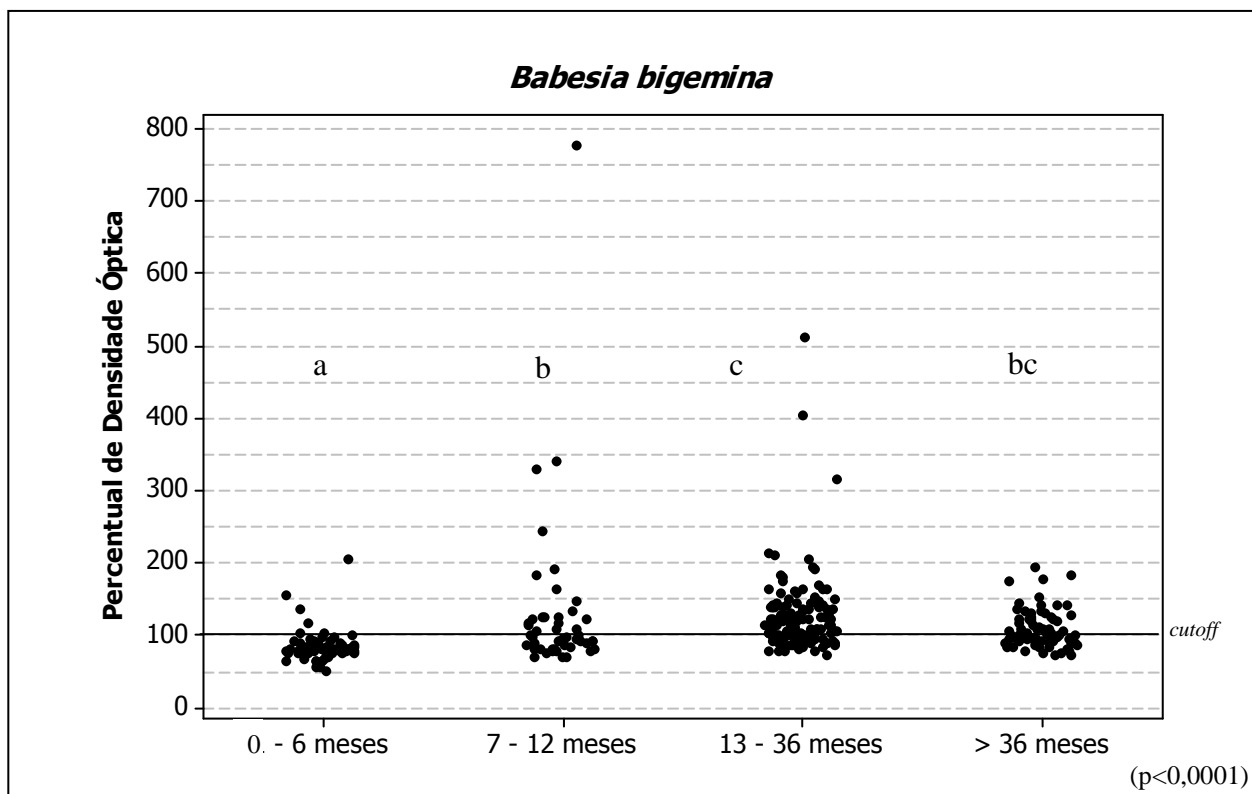
Linhas com valores seguidos por letras iguais não diferem entre si pelo teste Qui-quadrado a 5% de significância.



**Figura 7** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/cutoff) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Borrelia burgdorferi* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação à faixa etária dos animais. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelo teste de Kruskal Wallis com 95% de confiança.

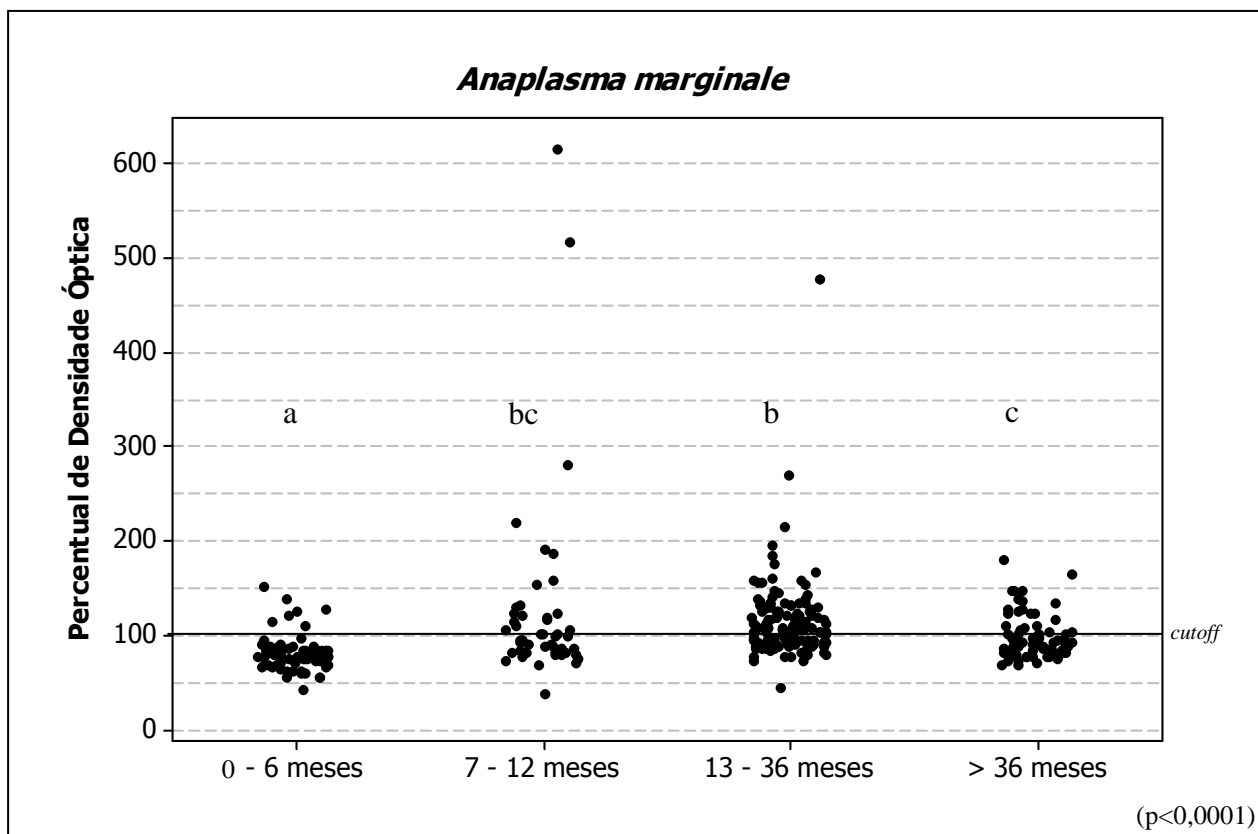


**Figura 8** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/cutoff) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Babesia bovis* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação à faixa etária dos animais. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelo teste de Kruskal Wallis com 95% de confiança.



**Figura 9** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/*cutoff*) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação à faixa etária dos animais. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelo teste de Kruskal Wallis com 95% de confiança.





**Figura 10** Distribuição dos Índices de Densidade Óptica (densidade óptica x 100/cutoff) de cada soro testado, obtidos por meio do ELISA indireto para pesquisa de anticorpos homólogos do tipo IgG anti-*Anaplasma marginale* em búfalos (*Bubalus bubalis*), em relação à faixa etária dos animais. Cada ponto representa um animal, cuja coleta de sangue foi realizada entre 06/2008 e 12/2009. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre as médias das categorias pelo teste de Kruskal Wallis com 95% de confiança.

Por meio do questionário realizado, foi observado que em quatro propriedades (23,6%) não era aplicado aos animais nenhum tratamento contra carrapatos. Todas as demais propriedades faziam aplicação de ivermectina (41,2%), banho acaricida (11,8%) ou ambos (23,6%). Quanto à periodicidade, foi registrado que 41,2% (7/17) das propriedades aplicavam o tratamento carrapaticida a cada seis meses; 5,9% (1/17) a cada quatro meses; 5,9% a cada dois meses e 23,5% (4/17) das propriedades realizavam tratamentos esporádicos. No entanto, apesar de 13 das 17 propriedades (76,5%) realizarem tratamento acaricida, foi observado no momento das coletas que 82,3% (14/17) delas apresentavam animais parasitados. Foram coletados e identificados os carrapatos das espécies *R. microplus*, *D. nitens* e *A. cajennense*, além do piolho *Haematopinus tuberculatus* e larvas de moscas da espécie *Dermatobia hominis*.

Durante as coletas nas propriedades foi observado que as infestações por carrapatos, em sua maioria, tratavam-se de larvas e ninfas. Talvez por isso, muitas vezes os tratadores dos animais diziam não haver carrapatos no rebanho, mesmo quando a infestação foi visualizada. Também ocorreu de o tratador informar que havia carrapatos e, no entanto, só foram observados piolhos. Estes fatos demonstram o desconhecimento quanto às espécies, formas e estágios de vida dos ectoparasitas que podem infestar a criação.

De acordo com as respostas obtidas por meio do questionário realizado em cada propriedade, foram analisadas as frequências de bubalinos soropositivos em relação à infestação por carrapatos, ao tratamento carrapaticida, ao objetivo da produção e ao tipo de criação para os quatro agentes estudados (**Tabela 4**). Para *B. bovis* e *B. bigemina* foi observada associação entre as frequências de soropositivos e a infestação por carrapatos ( $p < 0,05$ ), porém para *B. burgdorferi* e *A. marginale* a associação não ocorreu ( $p > 0,05$ ).

A transmissão das babesioses bovinas está mais intimamente relacionadas com a distribuição e a dinâmica populacional do seu vetor, o carrapato *R. microplus* (OLIVEIRA; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2004; CHAUVIN et al., 2009). Isto pode explicar a associação observada entre o número de positivos para *Babesia* sp. e a infestação por carrapatos. Em contrapartida, a possibilidade de *A. marginale* ser transmitido por artrópodes hematófagos ou até mesmo de forma iatrogênica (KESLLER, 2001), podendo garantir a infecção dos bubalinos por este agente etiológico mesmo na ausência do carrapato. Em relação a *Borrelia* sp., não há informações sobre outras formas de infecção no Brasil que não seja por meio de carrapatos. No entanto, segundo Magnarelli; Anderson (1988), há possibilidade de *B. burgdorferi* também ser transmitida por insetos hematófagos.

Quanto ao tratamento carrapaticida, animais submetidos a sistema de controle de carrapatos apresentaram frequência de soropositivos para *B. burgdorferi* e *B. bigemina* estatisticamente menor ( $p < 0,05$ ) do que animais não tratados. Fato não observado para *B. bovis* e *A. marginale*. Para estes agentes, o rebanho ser tratado ou não contra carrapatos não influenciou o número de positivos. *Anaplasma marginale*, como dito anteriormente, pode ter outras formas de transmissão que não a picada de carrapatos. Já a transmissão por *B. bovis* somente ocorre com o carrapato na fase de larva, enquanto que para *Borrelia* sp. e *B. bigemina* os estágios de ninfa e adultos são os de importância na transmissão (CALLOW, 1967; DALGLIESH; STEWART, 1983; BENACH et al., 1987; HODGSON, 1992). Como foi observado neste trabalho, a maioria das propriedades apresentavam infestação por carrapatos, principalmente larvas e ninfas e, segundo Starke et al. (1985), cerca de 75% dos carrapatos *R. microplus* que infestam búfalos estão no estágio de larva. Este fato pode favorecer a transmissão de *B. bovis*.

O objetivo da produção também demonstrou influência sobre a frequência de animais sororreagentes. A criação destinada à produção de carne apresentou maior percentual de positivos para *B. burgdorferi*, *B. bigemina* e *A. marginale* do que a criação destinada à produção leiteira e mista ( $p < 0,05$ ). O mesmo não foi observado para *B. bovis*, não havendo

diferença entre animais destinados a produção de leite e carne. Em propriedades leiteiras normalmente há um melhor sistema de manejo e controle de carrapatos, o qual não se mostrou tão eficiente para diminuir a frequência de soropositivos para *B. bovis* como foi para os outros agentes pesquisados neste trabalho.

O fator raça não foi avaliado, pois praticamente todos os animais foram declarados como mestiços e, por tanto, não foi relacionado ao objetivo da produção.

Embora fosse esperado que animais criados extensivamente tivessem maior probabilidade de infestação por carrapatos e assim mais chances de serem infectados com *B. burgdorferi* e os agentes da TPB, não foi observada diferença significativa entre as frequências de soropositivos detectada em animais criados intensiva, semi-intensiva ou extensivamente ( $p > 0,05$ ). Apenas para *B. bovis*, animais de criação semi-intensiva apresentaram maior frequência de soropositivos. Porém, esse dado perde relevância por se tratar de apenas uma propriedade a realizar criação semi-intensiva.

**Tabela 4** Frequência de anticorpos homólogos do tipo IgG contra *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*, detectados por meio do ELISA indireto em soros de búfalos (*Bubalus bubalis*), colhidos entre 06/2008 e 12/2009, considerando a infestação por carrapatos, o tratamento carrapaticida, o objetivo da produção e o tipo de criação.

Fator	N	<i>Borrelia burgdorferi</i>			<i>Babesia bovis</i>			<i>Babesia bigemina</i>			<i>Anaplasma marginale</i>		
		+	%	p	+	%	P	+	%	P	+	%	p
<b>Infestação*</b>													
Presente	197	113	57,4 <sup>a</sup>	0,467	111	56,3 <sup>a</sup>	0,027	79	40,1 <sup>a</sup>	0,011	81	41,1 <sup>a</sup>	0,441
Ausente	119	74	62,2 <sup>a</sup>		51	42,9 <sup>b</sup>		66	55,5 <sup>b</sup>		55	46,2 <sup>a</sup>	
<b>Tratamento Carrapaticida</b>													
Sim	230	124	53,9 <sup>a</sup>	0,0028	125	54,4 <sup>a</sup>	0,0957	91	39,6 <sup>a</sup>	< 0,004	94	40,9 <sup>a</sup>	0,2520
Não	86	63	73,3 <sup>b</sup>		37	43,0 <sup>a</sup>		54	62,8 <sup>b</sup>		42	48,8 <sup>a</sup>	
<b>Produção</b>													
Mista	45	20	44,4 <sup>a</sup>	< 0,0001	18	40,0 <sup>a</sup>	< 0,0001	16	35,6 <sup>a</sup>	< 0,0001	17	37,8 <sup>a</sup>	< 0,0001
Carne	110	90	81,8 <sup>b</sup>		65	59,1 <sup>b</sup>		80	72,7 <sup>b</sup>		69	62,7 <sup>b</sup>	
Leite	161	77	47,8 <sup>a</sup>		79	49,1 <sup>b</sup>		49	30,4 <sup>a</sup>		50	31,1 <sup>c</sup>	
<b>Criação</b>													
Extensiva	237	146	61,6 <sup>a</sup>	0,073	117	49,4 <sup>a</sup>	0,006	112	47,3 <sup>a</sup>	0,468	102	43,0 <sup>a</sup>	0,571
Intensiva	53	24	45,3 <sup>a</sup>		24	45,3 <sup>a</sup>		24	45,3 <sup>a</sup>		25	47,2 <sup>a</sup>	
Semi-Intensiva	26	17	65,4 <sup>a</sup>		21	80,8 <sup>b</sup>		9	34,6 <sup>a</sup>		9	34,6 <sup>a</sup>	

\* Infestação por carrapatos observada no momento da coleta de amostras dos animais.

N: número de amostras de soro analisadas por meio do ELISA indireto. +: número de amostras positivas. p: valor de p segundo o teste Qui-quadrado a 5% de significância. Nas colunas referentes a cada fator, valores seguidos de letras iguais não apresentam diferença estatística significativa.

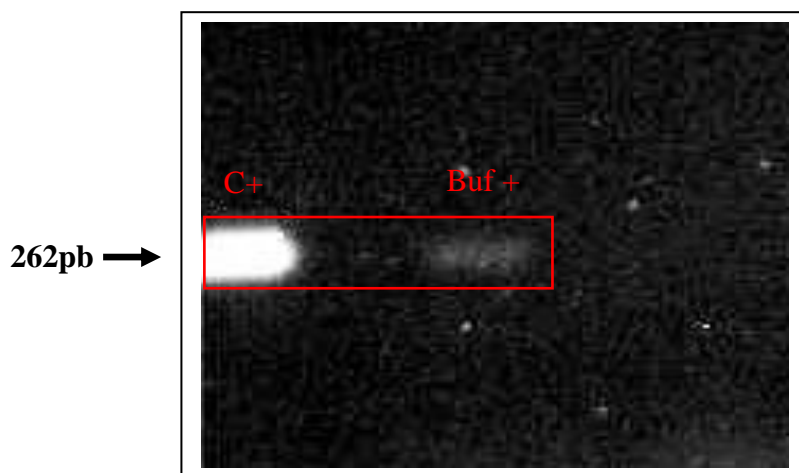
#### 4.4 Diagnóstico Molecular de *B. burgdorferi*, *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*, por Meio da Técnica de PCR

##### 4.4.1 *Borrelia burgdorferi*

Dos animais sorologicamente positivos no ELISA indireto para *B. burgdorferi*, cepa norte americana G39/40, 12 tiveram suas amostras sanguíneas submetidas à técnica de nPCR. Não houve positivos na primeira reação de PCR, porém com a nPCR uma amostra resultou positiva (**Figura 11**). Este animal, uma búfala de doze meses de idade proveniente da Microrregião Serrana, apresentou IDO no ELISA indireto para *B. burgdorferi* igual a 161.

A amostra positiva teve o fragmento amplificado sequenciado, apresentando homologia de 99% com *Borrelia burgdorferi flgE* gene (L43849) (**Figura 12**). É importante ressaltar que o controle positivo utilizado no teste das 12 amostras bubalinas não foi DNA de *B. burgdorferi*, mas sim de *B. garinii*, eliminando assim, qualquer possibilidade de contaminação nas etapas dos procedimentos.

Este resultado corrobora o estudo de Mantovani (2010), em que foi realizada a PCR para amplificação do gene *flgE* em material humano. Tanto no presente trabalho quanto no realizado por Mantovani (2010) a diferença entre as sequências amplificadas e a depositada no GenBank para o gene *flgE* de *B. burgdorferi*, foi de apenas dois pares de bases. Já a homologia entre a sequência obtida do material bubalino e de humanos no Brasil (MANTOVANI, 2010) foi de 100%. Este resultado fortalece a ideia de que bubalinos podem atuar como reservatórios do agente da borreliose no Brasil.



**Figura 11** C+ - Controle positivo *Borrelia garinii*; Buf+ - PCR positiva para o gene *flgE* (L43849) de *Borrelia burgdorferi* em amostra sanguínea bubalina de búfalo do estado do Rio de Janeiro colhida em 24/06/2009.

```

> gb|L43849.1|BORFLGE Borrelia burgdorferi flagellar hook protein (flgE) gene, complete
cds
Length=1499

Score = 477 bits (258), Expect = 1e-131
Identities = 262/264 (99%), Gaps = 0/264 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 TTTTGGGTGCAAATGTAGGTGAAGTTGGTGAGCAGCAAACCGTAAATTTGAAATTGGGAA 60
      |||
Sbjct 944 TTTTGGGTGCAAATGTAGGTGAAGTTGGTGAGCAGCAAACCGTAAATTTGAAATTGGGAA 1003

Query 61 CAGTTGGAAGTTACTGATTCAATTGCTCAGTTTGCTGATTCTAGTAGCACAAAGGCTA 120
      |||
Sbjct 1004 CAGTTGGAAGTTACTGATTCAATTGCTCAGTTTGCTGATTCTAGTAGCACAAAGGCTA 1063

Query 121 TTATTCAAGATGGATATGGCATGGGATATATGGAAAATTATGAAATTGATCAAATGGTG 180
      |||
Sbjct 1064 TTATTCAAGATGGATATGGCATGGGATATATGGAAAATTATGAAATTGATCAAATGGTG 1123

Query 181 TTATAGTTGGCATTATTCAAATGGCATAAGACGAGATCTTGGCAAGATTGCTCTTGCTT 240
      |||
Sbjct 1124 TTATAGTTGGCATTATTCAAATGGCATAAGACGAGATCTTGGCAAGATTGCTCTTGCTT 1183

Query 241 CTTTATGAATCCCGGAGGACTTG 264
      |||
Sbjct 1184 CTTTATGAATCCCGGAGGACTTG 1207

```

**Figura 12** Alinhamento da sequência da amostra bubalina positiva na PCR para o gene *Borrelia burgdorferi flagellar hook protein (flgE)* e a sequência do mesmo gene depositada no GenBank (L43849).

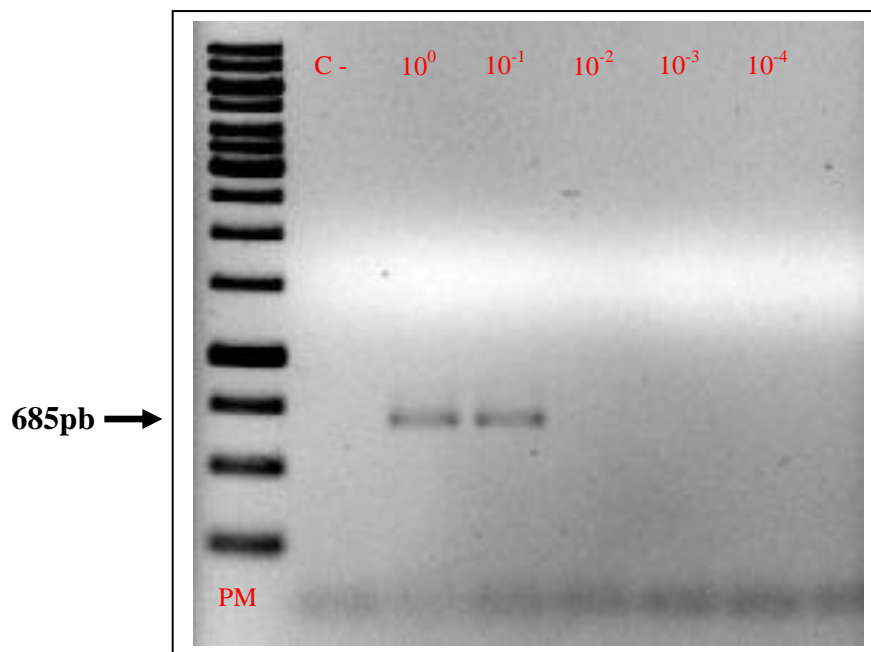
#### 4.4.2 *Babesia bigemina*

No teste de sensibilidade inicial realizado com a técnica de PCR descrita por Linhares et al. (2002), foi utilizado DNA de animal bubalino com parasitemia de 0,01% e hematimetria de  $8,63 \times 10^{-6}$ , ou seja, 575 parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue. Foi observado, então, capacidade de detecção de banda até a diluição de DNA até  $10^{-1}$ , o que representa aproximadamente detecção do DNA de 58 parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue (**Figura 13**).

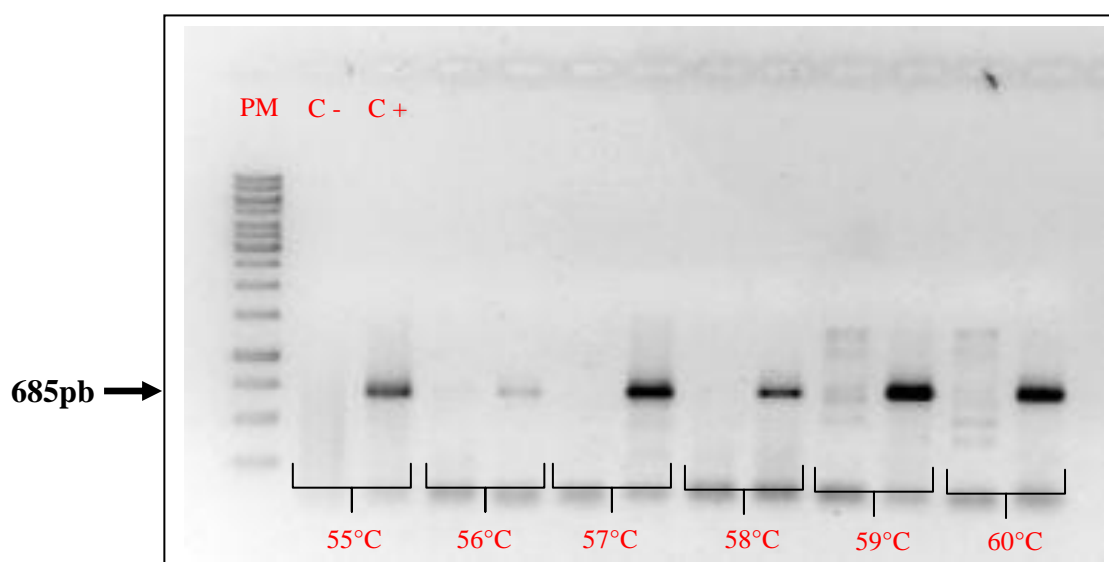
O teste com diferentes temperaturas de anelamento demonstrou melhor definição da banda formada à temperatura de  $58^{\circ}\text{C}$  (**Figura 14**), três graus a mais do que a temperatura descrita no trabalho original. A concentração de 2,5mM de  $\text{MgCl}_2$  foi a que conferiu maior eficiência enzimática na reação (**Figura 15**), enquanto que a recomendada no trabalho de Linhares et al. (2002) era de 1,5mM.

Quanto aos oligonucleotídeos iniciadores, a concentração de 0,2 $\mu\text{M}$  forneceu o melhor resultado (**Figura 16**), não diferindo da técnica original.

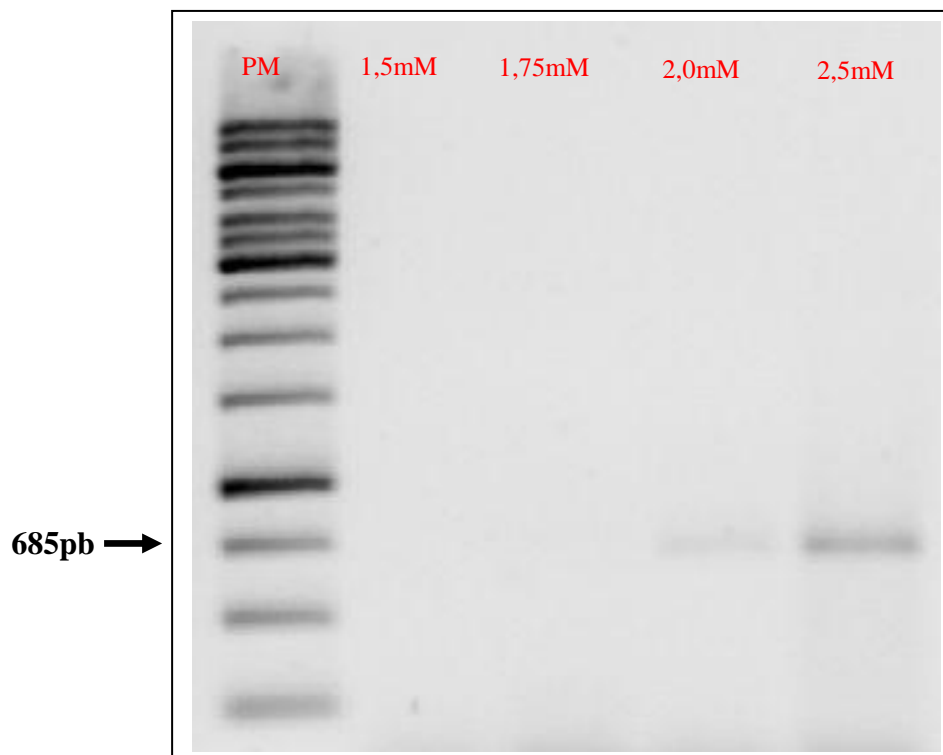
Devido ao grande número de ciclos usados nesta reação de PCR (40 ciclos), foi comparativamente testada a sua diminuição para 35 e 30 ciclos. Porém, houve sim uma diminuição significativa da sensibilidade da técnica. Então, o número de ciclos determinado por Linhares et al. (2002) foi mantido.



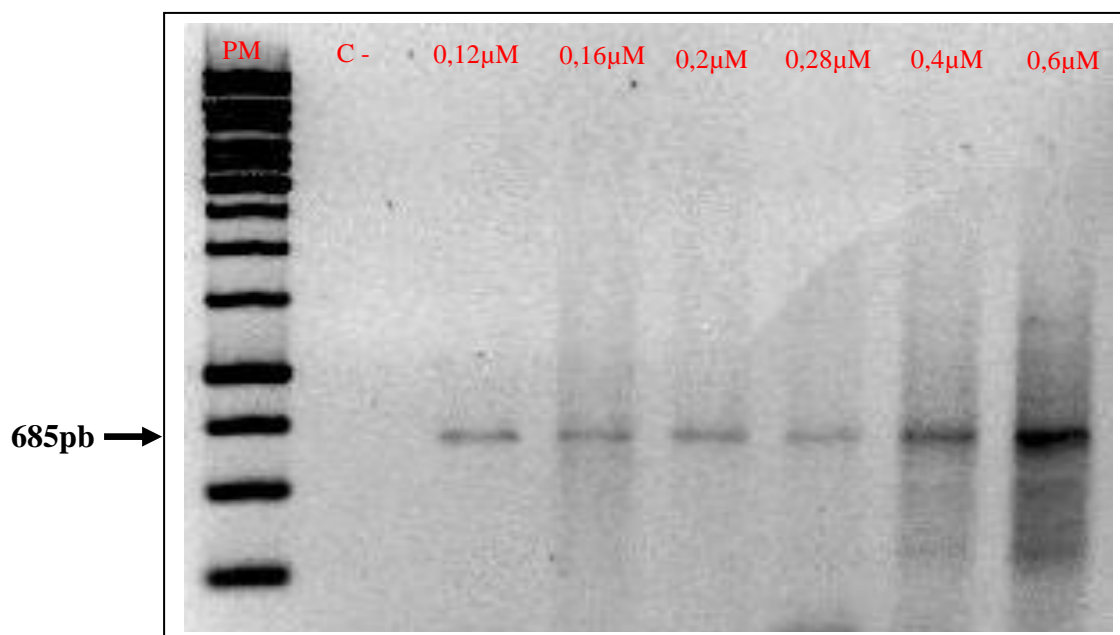
**Figura 13** Diluição de DNA bubalino positivo para *Babesia bigemina* – teste de sensibilidade inicial. PM – padrão de massa molecular 1Kb; C- – controle negativo (sem DNA).



**Figura 14** Gradiente de temperatura de anelamento da PCR para *Babesia bigemina*. PM – padrão de massa molecular 1Kb; C- – controle negativo (sem DNA); C+ - DNA bubalino positivo diluído a 10<sup>-1</sup>.



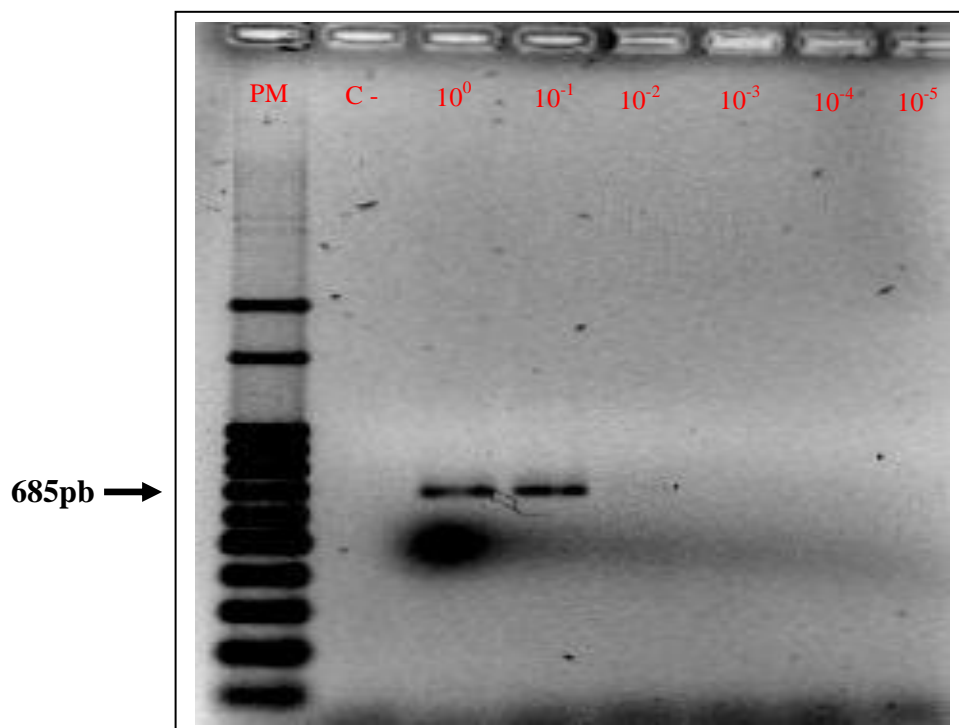
**Figura 15** Teste de quatro diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub>, usando DNA positivo para *Babesia bigemina* diluído a 10<sup>-2</sup>; PM – padrão de massa molecular 1Kb.



**Figura 16** Teste de sete diferentes concentrações de iniciadores GAU7/6 (LINHARES et al., 2002), usando DNA bubalino positivo para *Babesia bigemina* diluído a 10<sup>-1</sup>; PM – padrão de massa molecular 1Kb.



No teste de sensibilidade final, após as modificações inseridas na técnica, não foi observado formação de bandas após a diluição  $10^{-1}$ . Porém, as bandas foram mais nítidas e acredita-se que as modificações realizadas tenham contribuído para amplificação mais eficiente do produto desejado. Desta forma, a capacidade de detecção desta PCR foi estimada em aproximadamente 58 parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue (**Figura 17**), sendo eficiente para animais com parasitemia maior ou igual a 0,007%, embora Linhares et al. (2002) declare capacidade de detectar até três parasitas/mL de sangue utilizando a técnica original. Esta diferença pode ser devido a diferentes condições para realização da técnica neste trabalho, principalmente relacionada aos equipamentos e reagentes utilizados.



**Figura 17** Diluição de DNA bubalino positivo para *Babesia bigemina* – teste de sensibilidade final. PM – padrão de massa molecular 100pb; C- – controle negativo (sem DNA).

As 36 amostras selecionadas de animais positivos no teste ELISA indireto para *B. bigemina*, não foram positivas na PCR realizada para o agente. Porém, das 36 amostras negativas ao ELISA, uma resultou positiva. Este fato conduziu ao teste de todas as 295 amostras de DNA, mas o resultado, no entanto, se manteve em apenas uma amostra positiva, proveniente de um bezerro bubalino do município de Itaboraí, com menos de 30 dias de vida, infestado por carrapatos.

O resultado da PCR para *B. bigemina* ressalta a alta resistência dos bubalinos a este parasita, pois foi verificada a presença de anticorpos circulantes contra o agente, assim como a existência de infecção, porém com frequência muito baixa ou em níveis parasitêmicos abaixo do detectável pelo teste usado.

Não foram encontrados estudos sobre *B. bigemina* em búfalos utilizando a técnica de PCR. No entanto, na Índia, em regiões de estabilidade para o vetor, o diagnóstico de *B. bigemina* em rebanhos bubalinos por meio de esfregaços sanguíneos revelou apenas 4 e 7,4% de positivos, segundo Miranpuri et al. (1988) e Mishra et al. (1998), respectivamente. Na Argentina, a ocorrência de *Babesia* sp. em 9,57% dos búfalos de seis estabelecimentos criatórios foi reportada por Jacobo et al. (2005)

No Brasil, o diagnóstico de *B. bigemina* em bovinos por meio da técnica de PCR tem revelado altas taxas de prevalência nesses animais. Oliveira-Sequeira et al. (2004) analisaram amostras sanguíneas de 52 bovinos de São Paulo com até 4 meses idade, naturalmente infestados por *R. microplus* e observaram 92,6% de bezerros e 84,0% das vacas positivas para *B. bigemina*, utilizando técnica de nPCR. Utilizando também esta técnica, Kim et al. (2007) analisou o sangue de 92 bovinos do Mato Grosso do Sul e encontrou 52,2% positivos para este agente.

Estes dados revelam uma flutuação entre os percentuais de positivos obtidos pela técnica de PCR, mesmo em bovinos. A diferença entre estes valores pode estar relacionada a diferentes fatores, como o nível endêmico do agente na região estudada, o manejo aplicado ao rebanho, especialmente o controle de carrapatos, e também com o nível de sensibilidade da técnica de PCR utilizada.

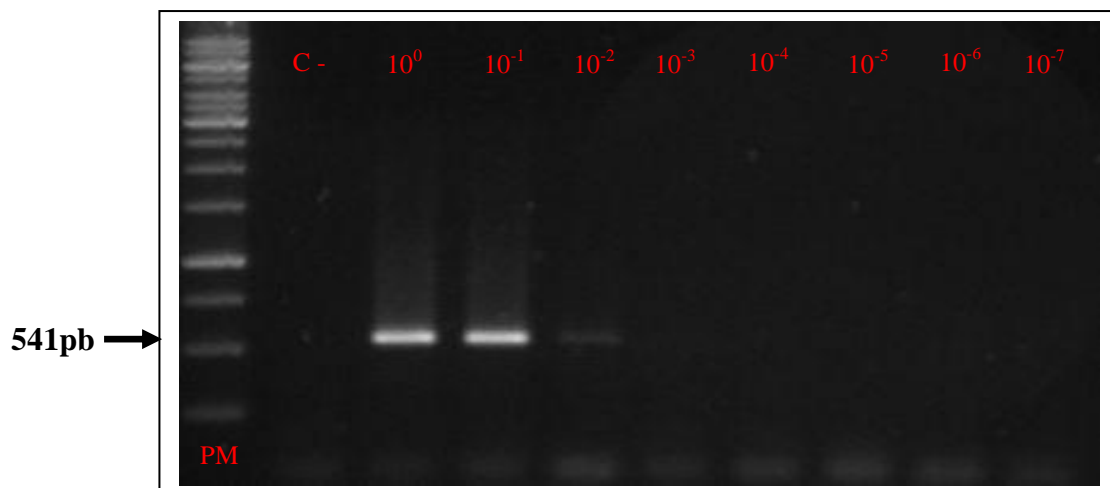
#### 4.4.3 *Babesia bovis*

O DNA positivo utilizado para cálculo da sensibilidade da técnica, foi proveniente de um bezerro bovino inoculado com *B. bovis*, que apresentou parasitemia de 0,5%, significando aproximadamente 20.715 parasitos/ $\mu$ L de sangue.

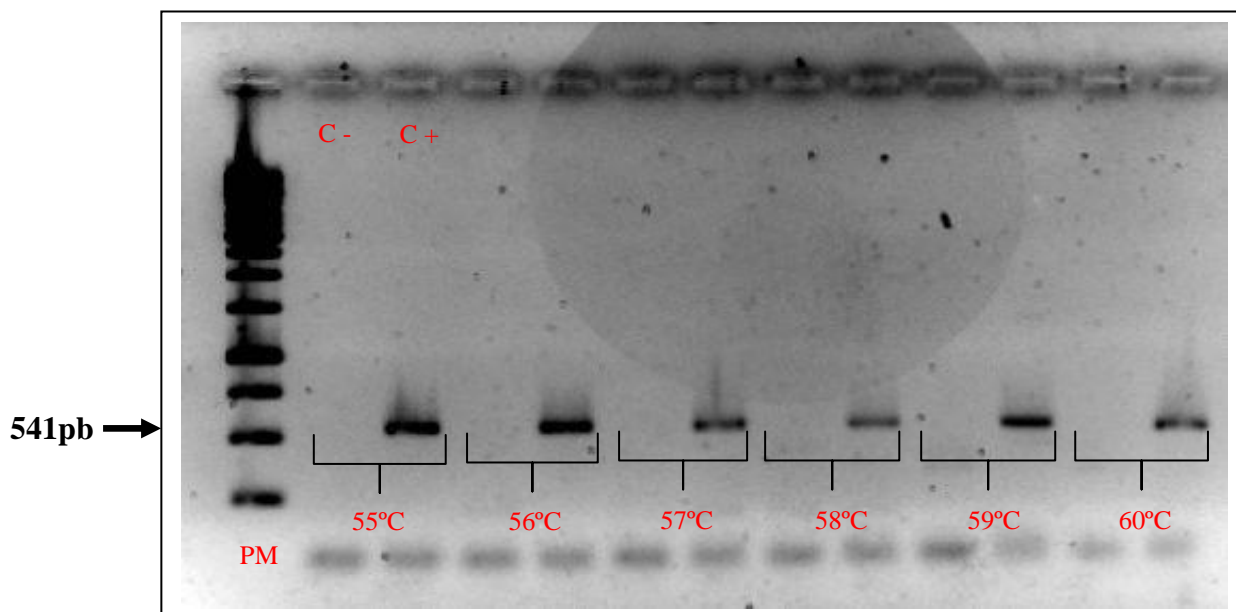
Para *B. bovis* a sensibilidade inicial da PCR mostrou detecção de banda até a diluição  $10^{-2}$ , correspondente a 207 parasitos/ $\mu$ L de sangue (**Figura 18**). Na reação padronizada por Linhares et al. (2002) foi utilizada temperatura de anelamento de 57°C, porém, entre as temperaturas testadas, a que apresentou o melhor resultado foi 56°C, como mostra a **Figura 19**. Observou-se formação de bandas inespecíficas com aumento progressivo da temperatura a partir de 57°C.

Para o  $MgCl_2$ , foi selecionada a concentração de 2,5mM, por conferir maior eficiência enzimática na reação, o que aumentou a replicação da sequência desejada (**Figura 20**), embora o trabalho em que esta técnica foi baseada recomendasse 1,5mM (LINHARES et al., 2002).

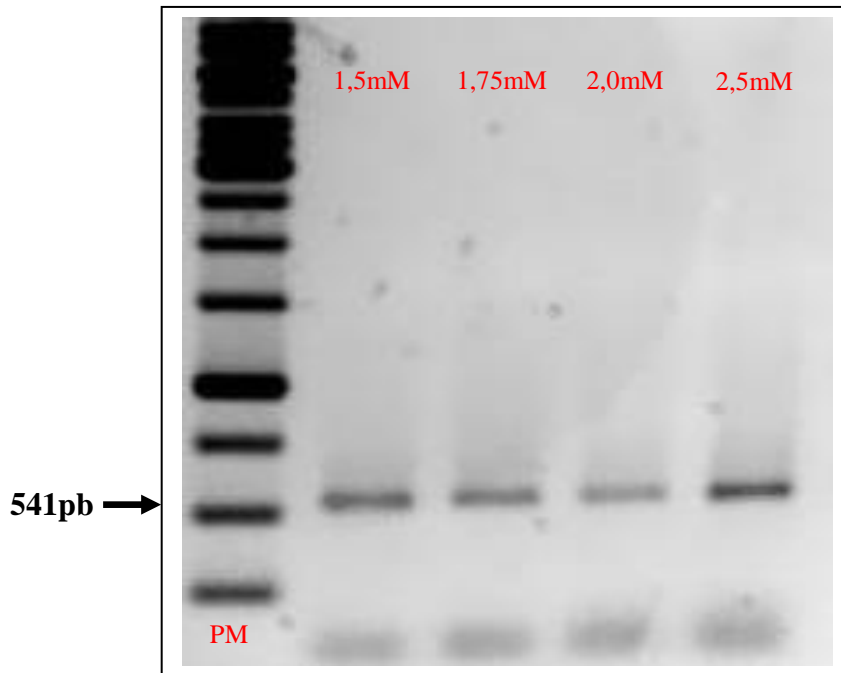
O aumento crescente da concentração de iniciadores gerou a formação de bandas inespecíficas, além da maior produção de dímeros de iniciadores (**Figura 21**). Desta maneira, foi mantida a concentração de 0,2 $\mu$ M, padronizada por Linhares et al. (2002).



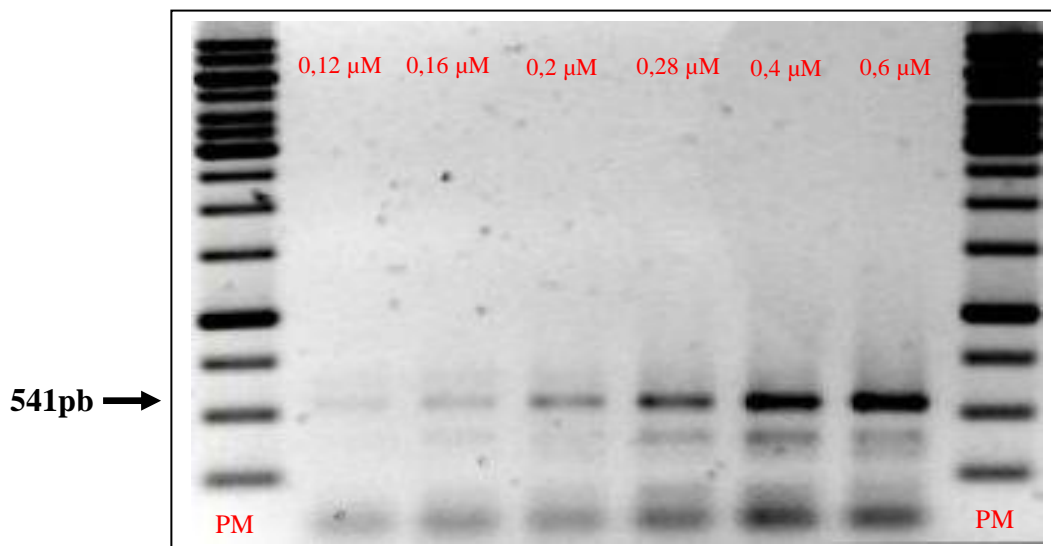
**Figura 18** Diluição de DNA bovino positivo para *Babesia bovis* – teste de sensibilidade inicial. PM – padrão de massa molecular 1Kb; C- – controle negativo (sem DNA).



**Figura 19** Gradiente de temperatura de anelamento da PCR para *Babesia bovis*. PM – padrão de massa molecular 1Kb; C- – controle negativo (sem DNA); C+ - DNA bovino positivo diluído a  $10^{-1}$ .



**Figura 20** Teste de quatro diferentes concentrações de  $MgCl_2$ , usando DNA positivo para *Babesia bovis* diluído a  $10^{-1}$ ; PM – padrão de massa molecular 1Kb.

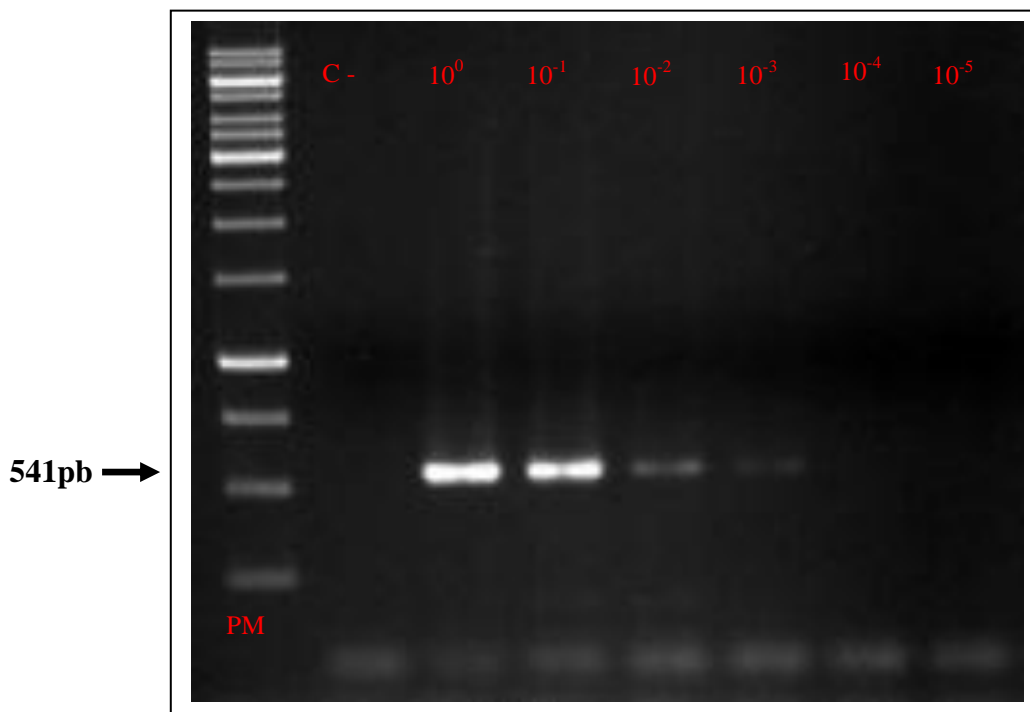


**Figura 21** Teste de seis diferentes concentrações de iniciadores GAU9/10 (LINHARES et al., 2002), usando DNA bovino positivo para *Babesia bovis* diluído a  $10^{-1}$ ; PM – padrão de massa molecular 1Kb.

A sensibilidade final demonstrou que as modificações realizadas foram positivas quanto ao aumento da capacidade de detecção do teste. Foi observada amplificação até a diluição de DNA  $10^{-3}$ , correspondente a cerca de 21 parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue (**Figura 22**), sendo eficiente para animais com até 0,003% de parasitemia. Entretanto, nenhuma das 36 amostras positivas ao ELISA indireto para *B. bovis*, assim como, nenhuma das 36 amostras negativas, foi positiva à PCR para este agente. Sabe-se que normalmente a parasitemia por *B. bovis* é menor do que por *B. bigemina*. Desta forma, após o resultado obtido para *B. bigemina*, foi esperado um resultado para *B. bovis* igual ou inferior. A partir destes dados, não foram testadas as demais amostras de DNA para *B. bovis*.

Após a observação de presença de anticorpos contra *B. bovis* no soro bubalino, tornou-se evidente a circulação deste agente etiológico na população de búfalos no estado do Rio de Janeiro. Faz-se, assim, necessário o uso de uma técnica mais sensível do que a PCR simples para diagnóstico de *B. bovis* em búfalos.

Um estudo epidemiológico sobre *B. bovis* em bubalinos realizado na Argentina, demonstrou 34% (35/103) dos animais positivos utilizando a técnica de nPCR. Este percentual foi semelhante aos 33,7% (31/92) de bovinos do Mato Grosso do Sul positivos também por nPCR (KIM et al., 2007), embora Oliveira-Sequeira et al. (2005) tenham observado 85,2% dos bezerros e 100% das vacas positivas para *B. bovis* em bovinos de São Paulo, utilizando a mesma técnica.



**Figura 22** Diluição de DNA bubalino positivo para *Babesia bovis* (541pb) – teste de sensibilidade final. PM – padrão de massa molecular 1Kb; C- – controle negativo (sem DNA).

#### 4.4.4 *Anaplasma marginale*

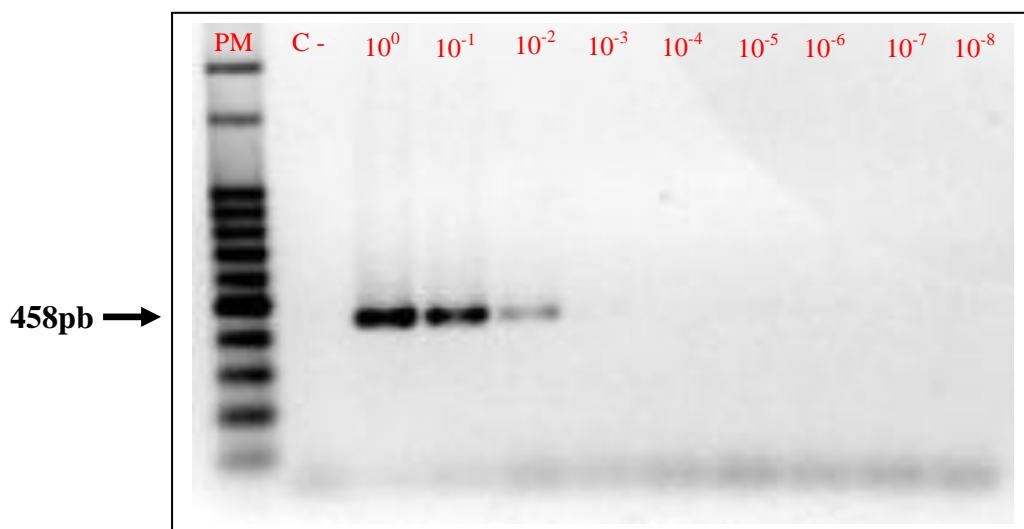
O DNA positivo utilizado no teste de sensibilidade para *A. marginale* apresentou parasitemia de 0,3%, resultando em aproximadamente 21.990 parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue. Assim, a técnica de PCR realizada conforme Torioni de Echaide et al. (1998), apresentou sensibilidade inicial até a diluição  $10^{-2}$ , o que significa uma estimativa de detecção de *A. marginale* de até 73,3 parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue (**Figura 23**).

Quanto ao gradiente de temperatura de anelamento testado, não foram observadas diferenças evidentes, desta forma, foi mantida a temperatura de  $65^{\circ}\text{C}$  recomendada no trabalho original (**Figura 24**).

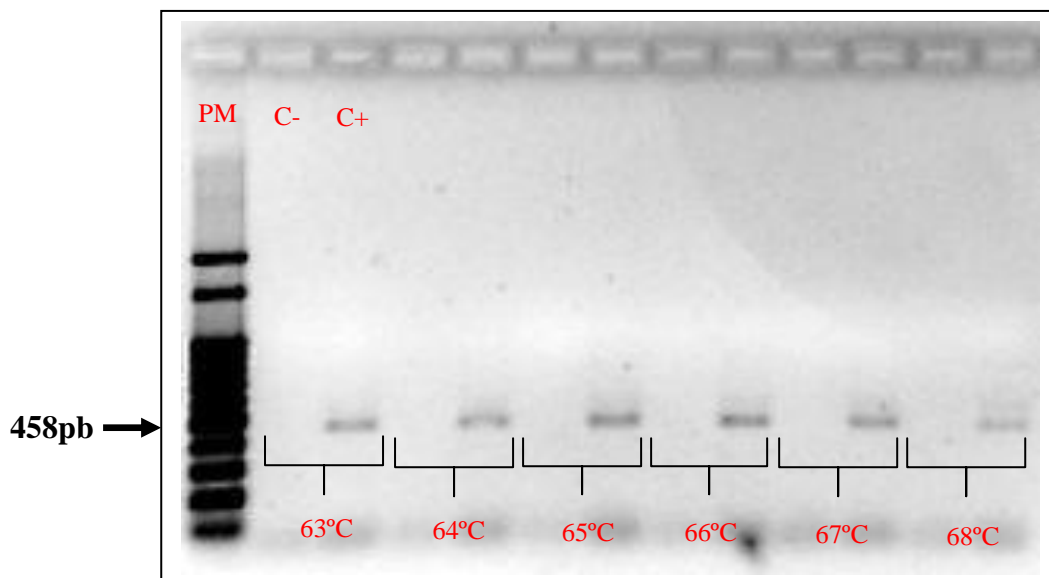
A intensidade das bandas apresentou aumento progressivo conforme foi aumentada a concentração de magnésio utilizada na reação (**Figura 25**). Assim como observado para os demais agentes estudados, a concentração de 2,5mM foi selecionada como melhor para aumentar a capacidade de detecção da técnica, diferindo da concentração descrita no trabalho original de 1,5mM.

A concentração de iniciadores (0,8 $\mu\text{M}$ ) utilizada no artigo de Torioni de Echaide et al. (1998), pareceu demasiado alta não apresentando diferença a partir da concentração de 0,4 $\mu\text{M}$ , a qual foi selecionada para preparo do mix da PCR (**Figura 26**).

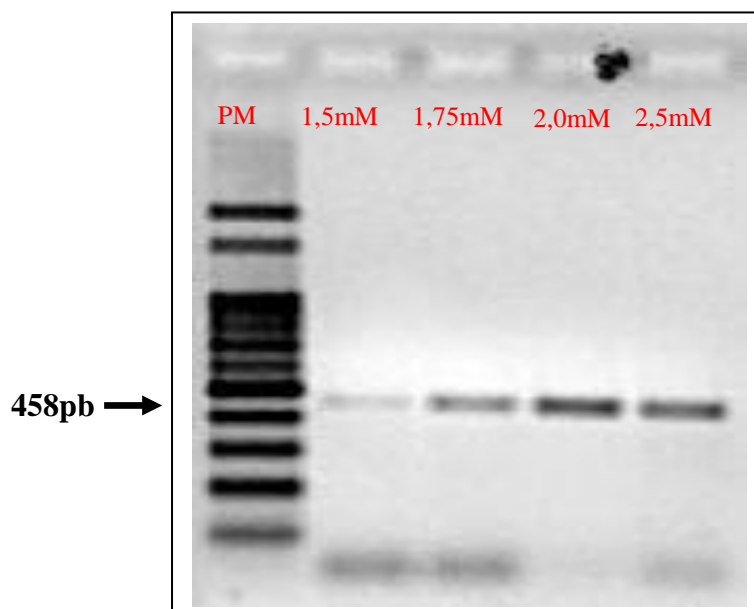
Após as modificações realizadas, foi obtida uma maior capacidade de detecção de animais positivos à PCR, uma vez que passou a ser observada visualização de bandas mais intensas, além de uma fraca banda até a diluição de DNA  $10^{-3}$  (**Figura 27**). Assim, foi conseguida uma técnica capaz de detectar até 7,33 parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue, em animais com parasitemia maior ou igual a 0,001%, quatro vezes mais sensível do que a encontrada para a PCR primária (30 parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue) descrita no artigo original da técnica por Torioni de Echaide et al. (1998).



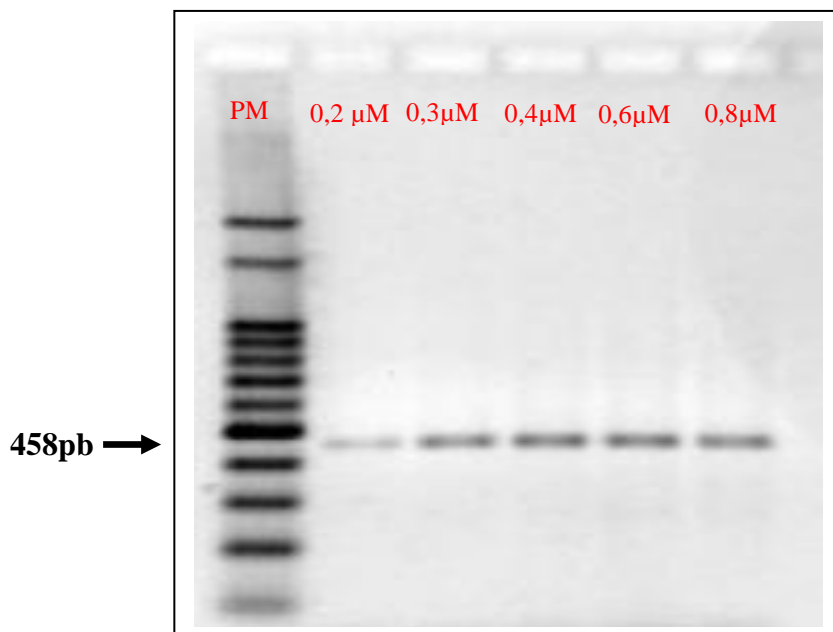
**Figura 23** Diluição de DNA positivo para *Anaplasma marginale* – teste de sensibilidade inicial. PM – padrão de massa molecular 100pb; C- – controle negativo (sem DNA).



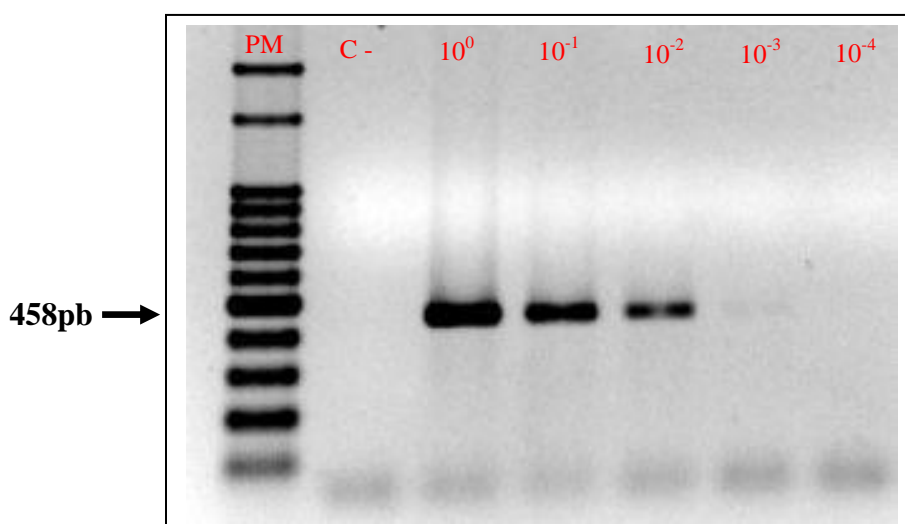
**Figura 24** Gradiente de temperatura de anelamento da PCR para *Anaplasma marginale*. PM – padrão de massa molecular 100pb; C- – controle negativo (sem DNA); C+ - controle positivo diluído a  $10^{-2}$ .



**Figura 25** Teste de quatro diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub>, usando DNA positivo para *Anaplasma marginale* diluído a  $10^{-2}$ ; PM – padrão de massa molecular 100pb.



**Figura 26** Teste de cinco diferentes concentrações de iniciadores, usando DNA positivo para *Anaplasma marginale* diluído a  $10^{-2}$ ; PM – padrão de massa molecular 100pb.



**Figura 27** Diluição de DNA positivo para *Anaplasma marginale* – teste de sensibilidade final. PM – padrão de massa molecular 100pb; C- – controle negativo (sem DNA).



A PCR para *A. marginale* realizada com as 295 amostras de DNA bubalino resultou positiva para 16 animais (5,42%). Este resultado comprova a infecção de bubalinos por esta rickettsia no Rio de Janeiro, porém apresentando baixa frequência e/ou baixo nível de parasitemia para ser detectável pelo teste utilizado. Sharma (1987) afirma que em bubalinos a parasitemia por *A. marginale* é rara e geralmente abaixo de 1%.

Não foram encontrados relatos sobre diagnóstico de *A. marginale* em búfalos por meio da técnica de PCR. Através de exame de esfregaço sanguíneo, Rajput et al. (2005) observaram 30% de positivos em um rebanho bubalino no Paquistão e, na Argentina, Jacobo et al. (2005) detectaram 61,7% dos bubalinos positivos para *A. marginale*.

Em bovinos, Torioni de Echaide et al. (1998) observaram 64% de positivos nos EUA, contando com a sensibilidade de uma nPCR. Assim como Molad et al. (2006), que verificaram 78% de bovinos positivos em área endêmica para *A. marginale* em Israel. Nestes trabalhos as técnicas de nPCR utilizadas apresentaram capacidade para detectar até 30 e 50 parasitos/mL de sangue, respectivamente. A PCR em tempo real (RT-PCR) também já foi empregada no estudo da anaplasmose em bovinos. Utilizando esta técnica, Carelli et al. (2007) encontraram 76,5% de positivos na Itália.

No presente estudo, o número de bubalinos positivos não mostrou associação com o sexo do animal, pois a chance de macho ou fêmea ser positivo foi de 50%. O mesmo foi observado por Rajput et al. (2005).

A frequência de positivos quanto à idade também não apresentou diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ), sendo 5,0% (3/60) para búfalos de 0 a 6 meses, 8,5% (4/47) para animais de 7 a 12 meses e 7,3% (9/124) para animais de 13 a 36 meses. Entre os 64 animais com mais de 36 meses não foram encontrados positivos, o que provavelmente certifica a maior resistência à infecção pelos búfalos nesta faixa etária.

Neste trabalho, não houve associação entre o resultado sorológico e molecular, pois entre os positivos na PCR para *A. marginale*, somente 50% foi positivo ao ELISA indireto para o mesmo agente. Observação semelhante foi feita por Ferreri et al. (2008), que constataram não haver associação entre os resultados de um ELISA competitivo e uma nPCR para *B. bovis* em búfalos. As técnicas de PCR e ELISA possuem alvos distintos e é plausível ser encontrada esta diferença, especialmente quando o teste sorológico tem como alvo IgG, que é uma imunoglobulina de memória. Assim, é necessário um período de tempo entre a infecção pelo agente e produção de IgG. O contrário também pode ocorrer, os anticorpos produzidos podem combater a infecção e o animal permanecer imunizado. Além disso, segundo Torioni de Echaide et al. (1998), no caso de *A. marginale*, que possui natureza cíclica, a rickettsemia periodicamente cai abaixo dos níveis detectáveis pela PCR.

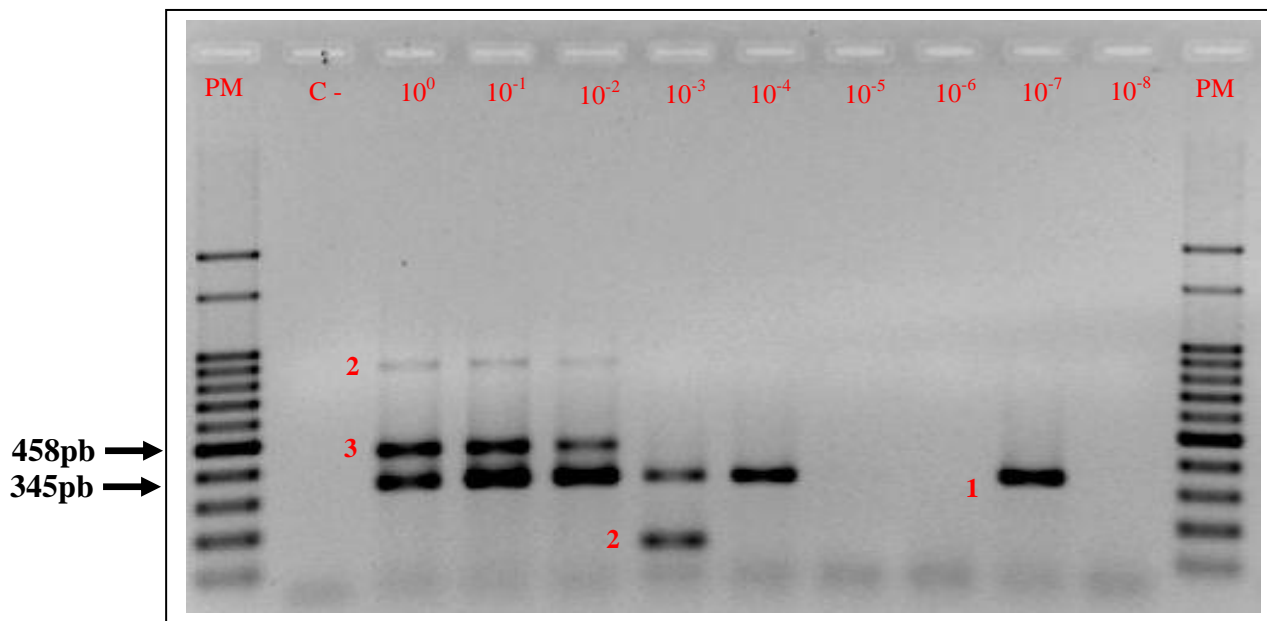
Para os três agentes da TPB, foi verificado que apesar da frequência de animais reagentes ao teste sorológico, a PCR revelou um percentual baixíssimo de positivos. De forma semelhante, Guido et al. (1994) observaram 49,4% de búfalos sorologicamente positivos no estado de São Paulo, porém quando realizado o diagnóstico direto por exame de esfregaço sanguíneo, nenhum animal foi positivo para *Babesia* sp. Diferentemente, Ferreri et al. (2008) observaram maior frequência de bubalinos positivos para *B. bovis* em diagnóstico feito por nPCR do que quando usado um ELISA competitivo. O fato de ter sido utilizada uma nPCR aumentou o nível de detecção do teste.

Devido à rusticidade dos animais bubalinos e a sua resistência a muitos agentes etiológicos, foi imaginado que o nível de parasitemia para *A. marginale* fosse baixo. Por isso, no presente trabalho foi selecionada a técnica de semi nPCR desenvolvida por Torioni de Echaide et al. (1998), a qual teria capacidade para detectar até 0,03 parasitas/ $\mu$ L de sangue, 244 vezes mais do que o conseguido neste trabalho.

Todo o trabalho foi conduzido no sentido de realizar a semi nPCR, porém, a partir de um determinado momento os resultados observados passaram a não fazer sentido e perderam

a confiabilidade. Acredita-se que a contaminação dos mixes tenha ocorrido durante os testes inviabilizando a realização da nPCR, pois foram frequentes as incoerências nos resultados sempre que usado os iniciadores internos da reação. Foram inúmeras tentativas de realizar o teste de sensibilidade da nPCR, pois este, por várias vezes, mostrou formação de fortes bandas em diluições improváveis de DNA positivo. Também foi observada a reamplificação do produto da primeira reação até a diluição  $10^{-2}$ , além de bandas inespecíficas que eventualmente apareciam (**Figura 28**).

No entanto, com base nos resultados moleculares obtidos para os agentes da TPB usando a PCR simples, sugere-se que técnicas com maior sensibilidade como a nPCR e a PCR em tempo real sejam padronizadas para o diagnóstico direto de *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* em bubalinos de forma a detectar baixas parasitemias, como ocorre no sangue destes animais.



**Figura 28** Diluição de DNA positivo para *A. marginale* (semi nPCR) – teste de sensibilidade. (1) Contaminação da diluição  $10^{-7}$ , (2) bandas inespecíficas e (3) banda da primeira reação (PCR). PM – padrão de massa molecular 100pb; C- – controle negativo (sem DNA).

## 5 CONCLUSÕES

Búfalos do estado do Rio de Janeiro apresentaram soropositividade na frequência de 59,2% para *B. burgdorferi*, 51,3% para *B. bovis*, 45,9% para *B. bigemina* e 42,0% para *A. marginale*.

O percentual de bubalinos do estado do Rio de Janeiro sororreagentes para *B. burgdorferi* e a detecção de um búfalo PCR positivo para o gene *flgE* deste agente indicaram a presença deste espiroquetídeo, ou outro similar antigênica e molecularmente, nesta população animal.

Os percentuais de animais sororreagentes para os agentes da tristeza parasitária bovina revelaram maior frequência de positivos para *Babesia* spp., sugerindo maior duração da resposta imune e/ou maior taxa de inoculação destes agentes por carrapatos em relação a *A. marginale*.

Não houve associação entre o sexo dos bubalinos e as frequências de animais positivos para *B. burgdorferi*, *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.

Fêmeas bubalinas apresentaram maior capacidade de responder intensamente à infecção por *B. burgdorferi*, *B. bigemina* e *A. marginale*.

Bubalinos do estado do Rio de Janeiro com até seis meses de idade foram menos soroprotégidos contra *B. burgdorferi*, *B. bovis* e *B. bigemina*.

Bubalinos do estado do Rio de Janeiro com até 12 meses de idade foram menos soroprotégidos contra *A. marginale*.

A frequência de animais soropositivos e a intensidade de resposta imune para *B. burgdorferi*, *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* tenderam a aumentar progressivamente até o animal atingir 36 meses de idade.

Búfalos apresentaram maior intensidade de resposta imune contra *B. burgdorferi*, *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* a partir dos sete meses de idade, sugerindo início da imunidade ativa.

Bubalinos do estado do Rio de Janeiro apresentaram baixas parasitemias por *B. bovis* e *B. bigemina*, não detectáveis pela técnica de PCR realizada.

A técnica de PCR para *A. marginale* foi eficiente para animais com parasitemia de até 0,001%, revelando uma frequência de 5,42% dos bubalinos do estado do Rio de Janeiro parasitados por este agente.

Não houve correlação entre os resultados do ELISA indireto e da PCR para o diagnóstico de *B. burgdorferi*, *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, I. S.; MARZAGÃO, G.; YOSHINARI, N. H.; SCHUMAKER, T. T. S. *Borrelia*-like spirochetes recovered from ticks and small mammals collected in the Atlantic Forest Reserve, Cotia county, state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 621-624, 2000.

ABCB – Associação Brasileira de Criadores de Búfalos. Disponível em: <www.bufalo.com.br> Acesso em: 7 out. 2010.

ALMERAULT, T. E.; ROBY, T. O. A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 153, n. 12, p. 1828-1834, 1968.

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, n. 3, p. 249–259, 2001.

ALEKSHUN, M.; KASHLEV, M.; SCHWARTZ, I. Molecular cloning and characterization of *Borrelia burgdorferi* rpoB. **Gene**, v. 186, n. 2, p. 227–235, 1997.

ALLEMAN, A. R., PALMER, G. H., MCGUIRE, T. C., MCELWAIN, T. F., PERRYMAN, L. E., BARBET, A. F. *Anaplasma marginale* major surface protein-3 (MSP-3) is encoded by a polymorphic multigene family. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 1, p. 156–163, 1997.

ALMEIDA, M. B.; TORTELLI, F. P.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J. L. M.; SOARES, M. P.; FARIAS, N. A. R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-20051. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 237-242, 2006.

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–10, 1990.

ANDERSON, J. F. Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 25, n. 8, p. 1495-1497, 1988.

ANTONIASSI, N. A. B.; CORRÊA, A. M. R.; SANTOS, A. S.; PAVARINI, S. P.; SONNE, L.; BANDARRA, P. M.; DRIEMEIER, D. Surto de babesiose cerebral em bovinos no estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.39, n. 3, p. 933-936, 2009.

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

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; BASTOS, P. A. S.; MARQUES, A. P. C. Frequência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 3, p. 243-246, 1998.

ARAÚJO, F. R.; MELO, V. S. P.; RAMOS, C. A. N.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H.; ALMEIDA, N. F.; ARAÚJO, G. S.; TORRES JR, R. A. A.; FRAGOSO, S. P.; ARAUCO, P. R. C.; BACANELLI, G.; OLIVEIRA, M. B.; SANTOS, L. R. Development of enzymelinked immunoabsorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 765-769, 2005.

ARTILES, J.; ALVES-BRANCO, F. P. J.; MARTINS, J. R.; CORREA, L. B.; SAPPER, M. F. M. Prevalência de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* no município de Bagé, RS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 2, supl. 2, p. 179, 1995.

AUSTIN, F. E. Maintenance of infective *Borrelia burgdorferi* Sh-2-82 in 4% oxygen- 5% carbon dioxide in vitro. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 1103-1110, 1993.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. 2007. 380p. Disponível em: <<http://euler.mat.ufrgs.br/~giacomo/Manuais-softw/Manual-BioEstat.pdf>> Acesso em: 13 out. 2010.

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

BACON, R. M.; BIGGERSTAFF, B. J.; SCHRIEFER, M. E.; GILMORE, R. D.; PHILIPP, M. T.; STEERE, A. C.; WORMSER, G. P.; MARQUES, A. R.; JOHNSON, B. J. Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic Elisas using recombinant VlsE1 or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with two-tiered testing using whole-cell lysates. **Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 8, p. 1187-1199, 2003.

BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; MYLER, P. J.; MCGUIRE, T. C. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 10, p. 2428-2435, 1987.

BARBET, A. F.; ALLRED, D. R. The *msp1* beta multigene family of *Anaplasma marginale*: nucleotide sequence analysis of an expressed copy. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 3, p. 971-976, 1991.

BARBOSA, M. F. R.; COSTA, J. O.; TAFURI, W. L. Transmissão congênita de *Babesia bovis*: relato de um caso em Minas Gerais – Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 5, p. 519-526, 1994.

BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F. Biology of *Borrelia* species. **Clinical Microbiology Reviews**, v.50, n. 4, p. 381-400, 1986.

BARREIRA, J. D.; ROSSI, M. I. D.; SILVA, G. V. O.; PIRES, F. A.; MASSARD, C. L. Caracterização morfológica e aspectos biológicos das formas evolutivas de *Babesia bigemina* (Smith; Kilborne, 1893) (Protozoa: Babesiidae) em *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2005.

BARROS-BATTESTI, D. M. Estudos de carrapatos e pequenos mamíferos silvestres naturalmente infectados com espiroquetas semelhantes à *Borrelia*, no município de

**Itapevi, estado de São Paulo.** Tese Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP. 116p., 1998.

BARROS-BATTESTI, D. M.; YOSHINARI, N. H.; BONOLDI, V. L. N.; GOMES, A. C. Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *I. loricatus* (Acari: Ixodidae) on Small Wild Mammals from an Atlantic Forest in the State of Sao Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 820-927, 2000.

BARROS-BATTESTI, D. M., ARZUA, M., BECHARA, G. H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical – Um guia ilustrado para identificação de espécies.** 1 ed. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. 223p.

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

BARRY, D. N.; PARKER, R. J.; DE VOS, A. J.; DUNSTER, P.; RODWELL, B. J. A microplate enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 3, p. 76-79, 1986.

BENACH, J. L.; COLEMAN, J. L.; SKINNER, R. A.; BOSLER, E. M. Adult *Ixodes dammini* on rabbits: a hypothesis for the development and transmission of *Borrelia burgdorferi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 155, n. 6, p. 1300-1306, 1987.

BENNETT, C. E. Ticks and Lyme disease. **Advances in Parasitology**, v. 36, p. 343-405, 1995.

BENXIU, J.; COLLINS, M. Seroepidemiologic survey of *Borrelia burgdorferi* exposure of dairy cattle in Wisconsin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 9, p. 1228-1231, 1994.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.

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

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*, *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 7, p. 461-464, 1999.

BOCK, R. E.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, n. 1, p. S247-S269, 2004.

BOONCHIT, S.; XUAN, X.; YOKOYAMA, N.; GOFF, W. L.; WAGNER, G.; IGARASHI, I. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant rhoptry-associated

protein 1 antigen against *Babesia bovis* for the detection of specific antibodies in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3771–3775, 2002.

BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T.; DE VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesioses. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 61-74, 1995.

BOSLER, E. M. Tick vectors and hosts. In: COYLE, P. K. **Lyme Disease**. Boston: Mosby Year Book, 1993. p. 18-26.

BOWIE, M. V.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. **Gene**, v. 282, n. 1-2, p. 95–102, 2002.

BRACARENSE, A. P. F. L.; VIDOTTO, O.; CRUZ, G. D. Transmissão congênita de *Babesia bovis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 4, p. 479-481, 2001.

BRAYTON, K. A.; KAPPMAYER, L. S.; HERNDON, D. R.; DARK, M. J.; TIBBALS, D. L.; PAMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES JR., D. P. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 3, p. 844–849, 2005.

BRAZ, J. R. C. J.; RIBEIRO, M. F.; LIMA, J. D.; PASSOS, L. M. Development of an ELISA system for detection of anti-*Anaplasma marginale* antibodies in cattle in Brazil. **Journal of Veterinary Medicine**, v. B47, n. 4, p. 241–248, 2000.

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

BUCHWALD, A. Ein Fall von diffuser idiopathischer Hautatrophie. **Derm Vierteljahresschr**, v. 10, p. 553-554, 1883.

BUENING, G. M.; BARBET, A.; MYLER, P.; MAHAN, S.; NENE, V.; MCGUIRE, T. C. Characterization of a repetitive DNA probe for *Babesia bigemina*. **Veterinary Parasitology**, v. 36, n. 1-2, p. 11-20, 1990.

BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ASENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBARCARETERO, J. C.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1-2, p. 16-25, 2007.

BURGDORFER, W.; BARBUR, A. G.; HAYES, S. F. Lyme disease: a tick-borne spirochetosis? **Science**, v.216, n. 4552, p. 1317-1319, 1982.

BURGESS, E. C.; AMUNDSON, T. E.; DAVIS, J. P.; KASLOW, R. A.; EDELMAN, R. Experimental inoculation of *Peromyscus* spp. With *Borrelia burgdorferi*: evidence of contact transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 2, p. 355-359, 1986.

- BURGESS, E. C.; GENDRON-FITZPATRICK, A.; WRIGHT, W. O. Arthritis and systemic disease caused by *Borrelia burgdorferi* in a cow. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 191, n. 11, p. 1468-1470, 1987.
- BURGESS, E. C. *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horses and cows. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 539, n. 1, p. 235-243, 1988.
- BUSHMICH, S. L. Lyme Borreliosis in Domestic Animals. **Journal of Spirochaetal and Ticks-Borne Diseases**, v. 1, n. 1. p. 24-28, 1994.
- BUTLER, J. F.; DENMARK, H. A. Tick (Acari: Ixodidae) vectors of Lyme disease organisms (*Borrelia burgdorferi*) in Florida. *Fla Department of Agriculture and Consumer Service Division of Plant Industry*. **The Entomology**. 1990. Circular nº 326.
- CALLOW, L. L. Observations on tick-transmitted spirochaetes of cattle in Australia and South Africa. **British Veterinary Journal**, v. 123, n. 11, p. 492-497, 1967.
- CALLOW, L. L.; PARKER, R. J.; RODWELL, B. J.; OTTLEY, M. L. Piroplasmosis in buffaloes and its serological diagnosis based on a homology between buffalo and bovine immunoglobulins. **Australian Veterinary Journal**, v. 52, n. 1, p. 40-41, 1976.
- CALLOW, L. L. **Animal health in Australia. Protozoal and rickettsial diseases**. Canberra: Australian Government Publishing Service, 1984. v. 5. 264 p.
- CAPUTA, A. C.; MURTAUGH, M. P.; BEY, R. F.; LOKEN, K. I. 110-Kilodalton recombinant protein which is immunoreactive with sera from humans, dogs, and horses with Lyme borreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 11, p. 2418-2423, 1991.
- CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; CECI, L.; BUONAVOGLIA, C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 1-2, p. 107–114, 2007.
- CHARLES, D. D.; JOHNSON, E. R. Liveweight gains and carcass composition of buffalo (*Bubalus bubalis*) steers on four feeding regimes. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 26, n. 2, p. 407-413, 1972.
- CHAUVIN, A.; MOREAU, E.; BONNET, S.; PLANTARD, O.; MALANDRIN, L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, p. 37, 2009.
- COCKRILL, W. R. O búfalo em ascensão: animal doméstico fundamental, criação, proteção e saúde animal. In: RAMOS, A. A.; VILLARES, J. B.; MOURA, J. C.(Ed.). **Os búfalos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1981. p. 01-54.
- COMSTEDT, P.; BERGSTRÖM, S.; OLSEN, B.; GARPMO, U.; MARJAVAARA, L.; MEJLON, H.; BARBOUR, A. G.; BUNIKIS, J. Migratory Passerine Birds as Reservoirs of Lyme Borreliosis in Europe. **Emerging Infectious Disease**, v. 12, n. 8, p. 1085-1095, 2006.
- CORONADO, A. Is *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*? Technical note. **Revista Científica FCV-LUZ**, v. 11, n. 5, p. 408–411, 2001.



CORRÊA, F. N. **Pesquisa de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em búfalos (*Bubalus bubalis*) do estado do Pará.** Dissertação Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 36p., 2007.

COSTA, C. L.; KOHAYAGAWA, A.; DELL'PORTO, A.; BOMFIM, S. R. M. Determinação dos níveis de anticorpos anti-*Babesia* spp. em bezerros bubalinos (*Bubalus bubalis*), desde o nascimento até um ano de idade. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 117-121, 1997.

CRAFT, J. E.; FISCHER, D. K.; SHIMAMOTO, G. T.; STEERE, A. C. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme Disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 78, n. 4, p. 934-939, 1986.

CORRIER, D. E.; GUZMAN, S. The effect of natural exposure to *Anaplasma* and *Babesia* infections on native calves in an endemic area of Colombia. **Tropical Animal Health Production**, v. 9, n. 1, p. 47-51, 1977.

DALAGNOL, C. A.; MARTINS, E.; MADRUGA, C. R. Prevalência de anticorpos contra *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* em bovinos de corte da região de clima Cfb. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 2, supl. 1, p. 220, 1995.

DALGLIESH, R. J.; STEWART, N. P. The use of tick transmission by *Boophilus microplus* to isolate pure strains of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* from cattle with mixed infections. **Veterinary Parasitology**, v. 13, n. 4, p. 317-323, 1983.

DALGLIESH, R. J.; JORGENSEN, W. K.; DE VOS, A. J. Australian frozen vaccines for the control of babesiosis and anaplasmosis in cattle: A review. **Tropical Animal Health Production**, v. 22, n. 1, p. 44-52, 1990.

D'ANDREA, L. A. Z.; SARTOR, I. F.; MADRUGA, C. R.; FREITAS, S. B. Z.; KROLL, L. B. E KRONKA, S. N. Condição imunológica de bovinos das raças Holandesa e Nelore frente a *Babesia bovis* e *B. bigemina* em duas regiões do estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 74-78, 2006.

DANTRAKOOL, A.; SOMBOON, P.; HASHIMOTO, T.; SAITO-ITO, A. Identification of a New Type of *Babesia* Species in Wild Rats (*Bandicota indica*) in Chiang Mai Province, Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 850-854, 2004.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; KOCAN, K. M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 65-76, 2001.

DE LA FUENTE, J.; NARANJO, V.; RUIZ-FONS, F.; VICENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A. N.; ALMAZÁN, C.; KOCAN, K. M.; MARTÍN, M. P.; GORTÁZAR, C. Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. **European Journal of Wildlife Research**, v. 50, n. 4, p. 187-196, 2004a.

DE LA FUENTE, J.; PASSOS, L. M. F.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; RIBEIRO, M. F. B.; FACURY-FILHO, E. J.; KOCAN, K. M. Genetic diversity and molecular phylogeny of

*Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 3-4, p. 307–316, 2004b.

DE LA FUENTE, J.; LEW, A.; LUTZ, H.; MELI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; MANGOLD, A. J.; ALMAZÁN, C.; NARANJO, V.; GORTÁZAR, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; GARCÍA-PÉREZ, A. L.; BARRAL, M.; OPORTO, B.; CECI, L.; CARELLI, G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75–89, 2005.

DE LA FUENTE, J.; RUYBAL, P.; MTSHALI, M. S.; NARANJO, V.; SHUQING, L.; MANGOLD, A. J.; RODRIGUEZ, S. D.; JIMENEZ, R.; VICENTE, J.; MORETTAL, R.; TORINA, A.; ALMAZAN, C.; MBATI, P. M.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; FARBER, M.; ROSARIO-CRUZ, R.; GORTAZAR, C.; KOCAN, K. M. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. **Veterinary Microbiology**, v. 119, n. 2-4, p. 382–390, 2007.

DOBY, J. M.; BIGAIGNON, G.; AUBERT, M.; IMBERT, G. Ectoparasites of the fox and Lyme borrelioses. Research on *Borrelia burgdorferi* in ixodid ticks and fleas (Siphonaptera). **Bulletin de la Societe Francaise de Parasitologie**, v. 9, n. 1, p. 279-288, 1991.

DOMINGUEZ, M.; ZABAL, O.; WILKOWSKY, S.; ECHAIDE, I.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; ASENZO, G.; RODRÍGUEZ, A.; ZAMORANO, P.; FARBER, M.; SUAREZ, C.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. Use of a Monoclonal Antibody against *Babesia bovis* Merozoite Surface Antigen-2c for the Development of a Competitive ELISA Test. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 1026, n. 1, p. 165–170, 2004.

DORWARD, D. W.; SCHWAN, T. G.; GARON, C. F. Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood or tissues from infected ticks, mice, dogs and humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 1162-1170, 1991.

DRESSLER, F.; WHALEN, J. A.; REINHARDT, B. N.; STEERE, A. C. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 12, p. 392-400, 1993.

DUMLER, J. S., BARBET, A. F., BEKKER, C. P. J., DASCH, G. A., PALMER, G. H., RAY, S. C., RIKIHISA, Y., RURANGIRWA, F. R. Reorganization of the genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145–2165, 2001.

DUZGUN, A.; SCHUNTNER, C. A.; WRIGHT, I. G.; LEATCH, G.; WALTISBUHL, D. J. A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* infections. **Veterinary Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 1-7, 1988.

EISEN, L.; LANE, R. Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: GRAY J.; KAHL O.; LANE R.; STANEK G. **Lyme borreliosis biology, epidemiology and control**. Wallingford: Cabi Publishing, 2002. p. 91–115.

- EL-GHAYSH, A.; SUNDQUIST, B.; CHRISTENSSON, D. A.; HILALI, M.; NASSAR, A. M. Observations on the use of ELISA for detection of *Babesia bigemina* specific antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 1-2, p. 51-61, 1996.
- ENGSTROM, S. M.; SHOOP, E.; JOHNSON, R. C. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 419-427, 1995.
- ERIKS, I. S.; PALMER, G. H.; MCGUIRRE, T. C.; ALLRED, D. R.; BARBET, A. F. Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. **Journal Clinical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 279-284, 1989.
- EWING, S. A., Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: HIDALGO, R.J., JONES, E.W. PROCEEDINGS OF THE 7TH NATIONAL ANAPLASMOSIS CONFERENCE. **Annals...Mississippi: Mississippi State University**, 1981. p. 395-423.
- FAHRIMAL, Y.; GOFF, W. L.; JASMER, D. P. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 1373-1379, 1992.
- FAJARDO, F. A. A piroplasmose bovina no Rio de Janeiro. **Revista de Medicina**, v.4, n. 18, p. 315-319, 1901.
- FARIAS, N. A. Tristeza parasitária bovina. In: RIET-CORREA, F.; SHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, 2007, v.1, p.524-532.
- FERREIRA, A. M.; SUZART, S.; VIDOTTO, O.; KNOWLES, D. P.; VIDOTTO, M. C. Use of repetitive DNA elements to define genetic relationships among *Anaplasma marginale* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 197, n. 2, p. 139-143, 2001.
- FERRERI, L.; BENITEZ, D.; DOMINGUEZ, M.; RODRIGUEZ, A.; ASENZO, G.; MESPLET, M.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; SCHNITTGER, L. Water Buffalos as Carriers of *Babesia bovis* in Argentina. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, n. 1, p. 149-151, 2008.
- FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Detection of *Babesia bigemina*-infected Carriers by Polymerase Chain Reaction Amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 10, p. 2576-2582, 1992.
- FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 1-2, p. 69-81, 1993.
- FIGUEROA, J. V., ALVAREZ, J. A., RAMOS, J. A., ROJAS, E. E., SANTIAGO, C., MOSQUEDA, J. J., VEGA, C. A., BUENING, G. M. Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 849, n. 1, p. 1-10, 1998.

FILGUEIRA, A. L.; TROPPE, B. M.; GONTIJO FILHO, P. P. Doença de Lyme. **Rio Dermatológico**, v. 2, n. 1, p. 1, 1989.

FRANQUE, M. P. **Perfil da Pecuária Leiteira e Aspectos Epidemiológicos do Complexo Tristeza Parasitária Bovina na Mesorregião Sul Espírito-santense, ES**. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 115p., 2010.

FRANZOLIN-NETO, R.; DELL'PORTO, A.; LACAZ RUIZ, R. Anaplasmosis and babesiosis: a clinical case in Buffalo (*Bubalus bubalis*) calf in Brazil. **Buffalo Bulletin**, v. 8, n. 3, p. 54-68, 1989.

FRASER C.; CASJENS S.; HUANG W.; SUTTON G.; CLAYTON R.; LATHIGRA R.; WHITE, O.; KETCHUM, K. A.; DODSON, R.; HICKEY, E. K.; GWINN, M.; DOUGHERTY, B.; TOMB, J. F.; FLEISCHMANN, R. D.; RICHARDSON, D.; PETERSON, J.; KERLAVAGE, A. R.; QUACKENBUSH, J.; SALZBERG, S.; HANSON, M.; VUGT, R. V.; PALMER, N.; ADAMS, M. D.; GOCAYNE, J.; WEIDMAN, J.; UTTERBACK, T.; WATTHEY, L.; MCDONALD, L.; ARTIACH, P.; BOWMAN, C.; GARLAND, S.; FUJII, C.; COTTON, M. D.; HORST, K.; ROBERTS, K.; HATCH, B.; SMITH, H. O.; VENTER, J. C. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. **Nature**, v. 390, n. 6660, p. 580–586, 1997.

FRENCH, D. F., MCELWAIN, T. F., MCGUIRE, T. C., PALMER, G. H. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 3, p. 1200–1207, 1998.

FREY, A.; CANZIO, J. D.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v. 221, n. 1-2, p. 35-41, 1998.

FUKUNAGA, M.; OKADA, K.; NAKAO, M.; KONISHI, T.; SATO, Y. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16SrRNA gene-targeted PCR analysis. **Microbiology and immunology**, v. 40, n. 11, p. 877–881, 1996.

FUTSE, J. E.; UETI, M. W.; KNOWLES JR, D. P.; PALMER, G. H. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3829–3834, 2003.

FRIEDHOFF, K. T. *Transmission of Babesia*. In: M. RISTIC (Ed). **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Florida: CRC Press, 1988. pp. 23-52.

GALIZA, G. J. N.; SILVA, M. L. C. R.; DANTAS, A. F. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, E. F. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 267-276, 2010.

GALO, K. R. **Frequência de anticorpos anti- *Borrelia burgdorferi* em equinos na mesorregião metropolitana de Belém, estado do Pará**. 2006. Dissertação Mestrado, Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará. 48p, 2006.

GILL, J. S.; MCLEAN, R. G.; SHRINER, R. B.; JOHNSON, R. C. Serologic surveillance for the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in Minnesota by using white-tailed deer as sentinel animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 444-451, 1994.

GOMES, R. A. **Resposta imune-humoral de búfalos (*Bubalus bubalis*) infectados naturalmente por *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale***. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de São Paulo. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. 92p., 2007.

GOMES, R. A.; MACHADO, R. Z.; STARKE-BUZETTI, W. A.; BONESSO, M. A. Resposta imune-humoral de búfalos (*Bubalus bubalis*) contra *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 73-80, 2008.

GONÇALVES, P. M.; PASSOS, L. M. F. Utilização do teste ELISA (sistema biotina-avidina) para detecção de anticorpos anti-*Babesia bovis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, supl. 1, p. 216, 1995.

GONÇALVES, P. M. Epidemiology and control of bovine babesioses and anaplasmosis in southeast region of Brazil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p.187-194, 2000.

GONZALES, E. F.; LONG, R. F.; TODOROVIC, R. A. Comparisons of the complement fixation, indirect fluorescent antibody, and card agglutination tests for the diagnosis of bovine anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 9, p. 1538-1541, 1978.

GORDILLO, G.; TORRES, J.; SOLÓRZANO, F.; CEDILLO-RIVERA, R.; TAPIA-CONYER, R.; MUÑOZ, O. Serologic evidences suggesting the presence of *Borrelia burgdorferi* infection in Mexico. **Archives of Medical Research**, v. 30, n. 1, p. 64-68, 1999.

GORDON, J. L.; SIBLEY, L. D. Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. **BMC Genomics**, v. 6, n. 1, p. 179, 2005.

GREENE, R. T.; WALKER, R. L.; NICHOLSON, W. L.; HEIDNER, H. W.; LEVINE, J. F.; BURGESS, E. C.; WYAND, M.; BREITSCHWERDT, E. B.; BERKHOFF, H. A. Immunoblot analysis of immunoglobulin G response to the Lyme disease agent (*Borrelia burgdorferi*) in experimental and naturally exposed dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 648-653, 1988.

GRODZICKI, R. L.; STEERE, A. C. Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 157, n. 4, p. 790-797, 1988.

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

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

GUIDO, M. C.; DELL'PORTO, A.; FUJII, T. U.; ARTES, R. Prevalence of hemoparasites in buffaloes from Ribeira Valley south coast of São Paulo, Brazil State-Brazil. In: WORLDR BUFFALO CONGRESS: 4<sup>th</sup>, 1994, São Paulo. **Proceedings...**São Paulo: 1994. p. 325-327.

GUSTAFSON, J. M.; BURGESS, E. C.; WACHAL, M. D.; STEINBERG, H. Intrauterine transmission of *Borrelia burgdorferi* in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 6, p. 882-890, 1993.

HABELA, M.; SOLANO, A.; ANTON, J. M.; BOTICARIO, D.; MORENO, F.; ROL, J. A. Aislamiento, identificación y transmisión experimental de *Babesia bigemina* en Extremadura (España). In: CONGRESO IBÉRICO DE PARASITOLOGÍA: IV, 1995, Santiago de Compostela. **Libro de resúmenes...** Santiago de Compostela: 1995. p. 104-105.

HADANI, A.; GUGLIELMONE, A. A.; BERMÚDEZ, A. C. Detección de espiroquetas del género *Borrelia* en bovinos de la provincia de Salta, Argentina. **Revista de Medicina Veterinaria Argentina**, v. 66, n. 5, p. 292-294, 1985.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advances in Parasitology**, v. 24, n. 1, p. 135-238, 1985.

HODGSON, J.H. Biology and transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 653, n. 1, p. 42-51, 1992.

HUNFELD, K. P.; HILDEBRANDT, A.; GRAY, J. S. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1219-1237, 2008.

HUNGERFORD, L. L.; SMITH, R. D. Variations in seroprevalence and host factors for bovine anaplasmosis in Illinois. **Veterinary Research Community**, v. 21, n. 1, p. 9-18, 1997.

HYDE, F. W.; JOHNSON, R. C.; WHITE, T. J.; SHELBURNE, C. E. Detecting of antigens in urine of mice and humans infected with *Borrelia burgdorferi*, etiologic agent of Lyme disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 58-61, 1989.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)> Acesso em: 05 jun 2007.

IICA - Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. **Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina**. San José: IICA, 1987. 79p.

IRVIN, A. D.; OMWOYO, P.; PURNELL, R. E.; PIERCE, M. A.; SCHIEMANN, B. Blood parasites of the impala (*Aepyceros melampus*) in the Serengeti National Park. **The Veterinary Record**, v. 93, n. 7, p. 200-203, 1973.

ISHIKAWA, M. M.; FONSECA, A. H.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; YOSHINARI, N. H. Padronização de ensaio imunoenzimático ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG contra *Borrelia burgdorferi* em bovinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 19, n. 4, p.166-168, 1997.

ISHIKAWA, M. M. **Epidemiologia da borreliose de Lyme em bovinos na região sudeste do Brasil e padronização do diagnóstico sorológico**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 51p., 1996.

ISHIKAWA, M. M. **Perfil da produção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* em bovinos e estudo de infecções simultâneas com diferentes estímulos antigênicos, em condições experimental e natural.** Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 80p., 2000.

JACOBO, R. A., CIPOLINI, M. F., STORANI, C. A., MARTÍNEZ, D. E., MARTÍNEZ, E. I. Infeción con el complejo tristeza em búfalos. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, resumen: V-063, 2005. Disponível em: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2005/4-Veterinaria/V-063>. Acesso em: 15 nov. 2010.

JAMES, J. C. S.; CORONADA, A.; LOPEZ, W.; MELENDEZ, R.; RISTIC, M. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. **Tropical Animal Health Production**, v. 17, n. 1, p. 9-18, 1985.

JOHNSON, R. C.; SCHIMID, G. P.; HYDE, F. W.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. *J. Borrelia burgdorferi* sp. Nov. etiologic agent of Lyme disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 496, 1984.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1-2, p. 1-10, 2006.

JOPPERT, A. M. **Estudo soro-epidemiológico da infecção por *Borrelia burgdorferi* em cães da região de Cotia, São Paulo.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-Universidade de São Paulo, São Paulo. 83p, 1995.

JWANG, B.; DEWING, P.; FIKRIG, E.; FLAVELL, R. A. The Hook Protein of *Borrelia burgdorferi*, Encoded by the *flgE* Gene, Is Serologically Recognized in Lyme Disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 2, n. 5, p. 609–615, 1995.

KANO, F. S., VIDOTTO, O., PACHECO, R. C., VIDOTTO, M. C. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 2, p. 131–138, 2002.

KARCH H., HUPPERTZ H.I., BÖHME M., SCHMIDT H., WIEBECKE D. & SCHWARZKOFF A. Demonstration of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples from healthy humans whose sera contain *B.burgdorferi*-specific antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2312-2314, 1994.

KAWABATA, H., MASUZAWA, T.; YANAGIHARA, Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. **Microbiology and Immunology**, v. 37, n. 11, p. 843–848, 1993.

KESSLER, R.H.; MADRUGA, C.R.; SCHENK, M.A.M.; RIBEIRO, O.C. Babesiose cerebral por *Babesia bovis* (Babes, 1888; Starcovici, 1893) em bezerros, no estado de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 18, n. 8, p. 931-935, 1983.

KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R.; JESUS, E. F.; SEMPREBOM, D. V. Isolation of pure strains of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* from cattle in an enzootic area, preliminary test. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, n. 7, p. 747-752, 1987.

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

KIESER, S. T., ERIKS, I. E., PALMER, G. H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 4, p. 1117–1119, 1990.

KIM, C.; ISEKI, H.; HERBAS, M. S.; YOKOYAMA, N.; SUZUKI, H.; XUAN, X.; FUJISAKI, K.; IGARASHI, I. Development of Taqman-Based Real-Time PCR Assays for Diagnostic Detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 837–841, 2007.

KNOWLES, D. P.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; PALMER, G.; MCGUIRE, T.; STILLER, D.; MCELWAIN, T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, 1996.

KOCAN, K. M.; GOFF, W. L.; STILLER, D.; CLAYPOOL, P. L.; EDWARDS, W.; EWING, S. A.; HAIR, J. A.; BARRON, S. J. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible cattle. **Journal of Medical Entomology**, v. 29, n. 4, p. 657–668, 1992a.

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 infected to susceptible cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 4, p. 499–507, 1992b.

KOCAN, K. M., DE LA FUENTE, J., GUGLIELMONE, A. A., MELENDÉZ, R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 698–712, 2003.

KOCAN, K.M., 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. **Parasitology**, v. 129, n. 1, p. S285–S300, 2004a.

KOCAN, K.M., DE LA FUENTE, J.C., GOLSTEYN THOMAS, E.J., VAN DEN BUSSCHE, R.A., HAMILTON, R.G., TANAKA, E.E., DRUHAN, S.E., KOCAN, K.M. Recent studies on the characterization of *Anaplasma marginale* isolated from North American bison. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 1026, n. 1, p. 114–117, 2004b.

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

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 8. ed. v. 1, Baltimore: Williams e Wilkins, 1984. 2255 p.

KUTTLER, K. L. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 20, n. 1, p. 12–20, 1984.



KUTTLER, K. L. "Bovine Babesiosis." In Foreign Animal Diseases "The gray Book" - 1998. Disponível em: <<http://www.cesa.net/library/Foreign%20Animal%20Diseases-The%20Gray%20Book-1998-6th%20Edition.pdf>> Acesso em: 15 nov. 2010.

LANE, R. S.; BURGDORFER, W. Transovarial and transstadial passage of *Borrelia burgdorferi* in the western black-legged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 37, n. 1, p. 188-192, 1987.

LANE, R. S.; MANWEILER, S. A. *Borrelia coriaceae* its tick vector, *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae) with emphasis on transstadial and transovarial infections. **Journal of Medical Entomology**, v. 25, n. 3, p. 172-177, 1988.

LAÚ, H. D. **Doenças em búfalos no Brasil – Diagnóstico, epidemiologia e controle**. Belém: Embrapa, 1999. 202p.

LE FLECHE, A.; POSTIC, D.; GIRARDET, K.; PETER, O.; BARANTON, G. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 921–925, 1997.

LEW, A. E.; BOCK, R. E.; MINCHIN, C. M.; MASAKA, S. A *m脾1a* polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 325–335, 2002.

LEW, A.; JORGENSEN, W. Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 292-302, 2005.

LIANG, F. T.; YAN, J.; MBOW, M. L.; SVIAT, S. L.; GILMORE, R. D.; MAMULA, M.; FIKRIG, E. *Borrelia burgdorferi* Changes Its Surface Antigenic Expression in Response to Host Immune Responses. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5759-5767, 2004.

LIU, Z.; ZHAO, J.; MA, L.; YAO, B. *Babesia orientalis* sp. nov., a parasite of buffaloes (*Bubalus bubalis*) in China. **Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica**, v. 28, n. 1, p. 84-89, 1997.

LINHARES, G. F. C.; SANTANA, A. P.; LAUEMAN, L. H.; MADRUGA, C. R. Assessment of iniciadores designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 27-32, 2002.

LOPES, C. W. G. **Ocorrência de protofitas em ruminantes e suínos domésticos, ainda não descritos no Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 52p., 1976.

LÖHR, C. V.; RURANGIRWA, F. R.; MCELWAIN, T. F.; STILLER, D.; PALMER, G. H. Specific expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 salivary gland variants occurs in the midgut and is an early event during tick transmission. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 114–120, 2002.

LOWRY, O. H.; ROSERBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 2, p. 265-275, 1951.

MCCOSKER, P. J. The global importance of babesiosis. In M RISTIC, J. P. Krier (eds), **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981. p. 1-24.

MADRUGA, C. R.; GOMES, R. F.; SCHENK, M. A. M. **Etiologia de algumas doenças de bezerros de corte no estado de Mato Grosso do Sul**. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1984. 27p. (Circular Técnica 15)

MADRUGA, C. R.; KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M.; LIMA, J. G.; GOMES, R. C. C.; BERNE, M. E. A. **Diagnóstico da tristeza parasitária bovina no estado do Mato Grosso do Sul: Inquérito de opinião**. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1986. 32p. (Circular Técnica 18)

MADRUGA, C. R.; HONER, M. R.; ANDREOTTI, R.; ARAÚJO, F. R.; SANTARÉM, V. Simulação e sorologia no mapeamento da instabilidade endêmica das babesioses: um estudo nas regiões do Boqueirão e Cariri, estado da Paraíba. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. **Anais...** Londrina, 1993.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; MARQUES, A. P. C.; CARVALHO, C. M. E.; CUSINATO, F. Q.; CROSSI, A. J.; KESSLER, R. H.; MIGUITA, M. Desenvolvimento de uma prova de imunoabsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 4, 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 enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 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.; CROSSI, A. J.; QUEIRÓZ, R. A. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and its application in an epidemiological survey in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 72-76, 2001.

MADUREIRA, R. C. **Frequência de anticorpos homólogos anti-Borrelia burgdorferi em equinos dos municípios de Três Rios, Vassouras e Valença, estado do Rio de Janeiro**. 2004. 40f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

MADUREIRA, R. C. **Sorologia para Borrelia burgdorferi para equinos do estado do Pará e caracterização genotípica de isolados de Borrelia spp.** 2007. 73f. Tese Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

MAGNARELLI, L. A.; MEEGAN, J. M.; ANDERSON, J. F.; CHAPPELL, W. A. Comparison of an indirect fluorescent-antibody test with an enzyme-linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 181-184, 1984.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; JOHNSON, R. C. Cross-reactivity in Serological Tests for Lyme Disease and Other Spirochaetal Infections. **The Journal of Infectious Disease**, v. 156, n. 1, p. 183-187, 1987.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F. Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 1482-1486, 1988.

MAGNARELLI, L. A.; MILLER, J. N.; ANDERSON, J. F.; RIVIERE, G. R. Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p.1276-1279, 1990.

MAGNARELLI, L. A.; FLAVELL, R. A.; PADULA, S. J.; ANDERSON, J. F.; FIRKRIG, E. Serologic diagnosis of canine and equine borrelioses: use of recombinant antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 169-173, 1997.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of class-specific immunoglobulins to *Borrelia burgdorferi*. **American Journal of Epidemiology**, v. 127, n. 4, p. 818-825, 1998.

MAGNARELLI, L. A.; BUSHMICH, S. L.; SHERMAN, B. A.; FIKRIG, E. A comparison of serologic tests for the detection of serum antibodies to whole-cell and recombinant *Borrelia burgdorferi* antigens in cattle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 45, n. 8, p. 667-674, 2004.

MAGNARELLI, L. A.; WILLIAMS, S. C.; FIKRIG, E. Seasonal prevalence of serum antibodies to whole cell and recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer in Connecticut. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 781-790, 2010.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 5, p. 292-298, 1972.

MANTOVANI, E., COSTA, I. P., GAUDITANO, G., BONOLDI, V. L., HIGUCHI, M. L., YOSHINARI, N. H. Description of Lyme disease-like syndrome in Brazil. Is it a new tick borne disease or Lyme disease variation? **Brazilian Journal Medical Biology Research**, v. 40, n.1, p. 443-56, 2007.

MANTOVANI, E. **Identificação do agente etiológico da Doença de Lyme-símile brasileira (Síndrome Baggio-Yoshinari)**. 2010. 117f. Tese Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

MARCONI, R. T.; LIVERIS, D.; SCHWARTZ, I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme

disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2427–2434, 1995.

MARTINS, J. R.; CERESER, V. H.; CORREA, B. L.; SMITH, R. D. *Borrelia theileri*: observação em carrapatos do gênero *Boophilus microplus* no município de Guaíba, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 26, n. 3, p. 447-450, 1996.

MASUZAWA, T.; TAKADA, N.; KUDEKEN, M.; FUKUI, T.; YANO, Y.; ISHIGURO, F.; KAWAMURA, Y.; IMAI, Y.; EZAKI, T. *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 1817–1824, 2001.

MATHER, T. N.; FISH, D.; COUGHLIN, R. T. Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 205, n. 2, p. 186-188, 1994.

MATHIAS, L. A.; CHAVES, L. F.; GÍRIO, R. J. S.; DEL FAVA, C. Avaliação de um teste imunoenzimático competitivo no diagnóstico sorológico da brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 3-4, p. 111-114, 1998.

MATTON, P.; MELCKEBEKE, H. V. Bovine borrelioses: comparison on simple methods for detection of spirochaete in the blood. **Tropical Animal Health Production**, v. 22, n. 3, p. 147-152, 1990.

MAY, C.; BENNET, D.; CARTER, S. D. Lyme disease in the dogs. **The Veterinary Record**, v. 126, n. 12, p. 293, 1990.

MCELWAIN, T. F.; HINES, S. A.; PALMER, G. H. Persistence of antibodies against epitopes encoded by a single gene copy of the *Babesia bovis* merozoite surface antigen 1 (MSA-1). **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 449-452, 1998.

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

MIRANPURI, G. S. Tick parasitising the Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) and their possible role in disease transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 27, n. 3-4, p. 357-362, 1988.

MISHRA, A. K., REDDY, G. G. B.; RAO, J. R.; TEWARI, A. K. Detection of *Babesia bigemina* antibodies by Dot-Elisa in cattle and buffaloes. **Acta Parasitologica**, v. 43, n. 1, p. 43-45, 1998.

MLADENović, J.; CEKANAC, R.; STAJKOVIĆ, N.; KRSTIĆ, M. Risk of Lyme disease development after a tick bite. **Vojnosanitetski Pregled**, v. 67, n. 5, p. 369-74, 2010.

MOLAD, T.; MAZUZ, M. L.; FLEIDEROVITZ, L.; FISH, L.; SAVITSKY, I.; KRIGEL, Y.; LEIBOVITZ, B.; MOLLOY, J.; JONGEJAN, F.; SHKAP, V. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1-2, p. 55–62, 2006.

MOLLOY, J. B.; BOWLES, P. M.; JESTON, P. J.; BRUYERES, A. G.; BOWDEN, J. M. Á; BOCK, R. E.; JORGENSEN, W. K.; BLIGHT, G. W.; DALGLIESH, R. J. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle. **Parasitology Research**, v. 84, n. 8, p. 651-656, 1998.

MOTALEB, M.; CORUM, L.; BONO, J.; ELIAS, A.; ROSA, P.; SAMUELS, D.; CHARON, N. *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 20, p. 10899-10904, 2000.

MOTER, S. E.; HOFMANN, H.; WALLISH, R.; SIMON, M. M.; KRAMER, M. D. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronic atrophicans by ospA-specific PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 12, p. 2980-2988, 1994.

MOURA, A. B.; VIDOTTO, O.; YAMAMURA, M. H.; VIDOTTO, M. C.; PEREIRA, A. B. Studies on the *Anaplasma marginale* Theiler, 1910 infection in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) using 'nested' PCR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 27-32, 2003.

MURALEEDHARAN, K.; SYED ZIAUDDIN, K.; GOPALASWAMY, K.; MURALEEDHAR, T.; SESHADRI, S. J. Some observations on clinical cases of *Babesia bovis* (Babes, 1888) Starcovici, 1893, in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **The Indian Veterinary Journal**, v. 61, n. 1, p. 76-79, 1984.

NEITZ, W. O. The transmission of *Spirochaeta theileri* to a Blesbuck (*Damaliscus albifrons*). **Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry**, v. 5, n. 1, p. 7, 1935.

NDUNG'U, L. W.; AGUIRRE, C.; RURANGIRWA, F. R.; MCELWAIN, T. F.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, D.; PALMER, G. H. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 675-679, 1995.

NITHIKATHKUL, C.; POLSEELA, P.; CHANGSAP, B.; LEEMINGSAWAT, S. A Study of ixodid ticks on domestic animals in Samut Prakan Province, Thailand. **Southeast Asian Journal Tropical Med Public Health**, v. 33, supl. 3, p. 41-44, 2002.

OBERLE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F. Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 12, p. 5245-5251, 1993.

OLEGARIO, L. A. O.; LIMA, R. F.; PICOLOTO, G.; FREITAS, A. S.; MADRUGA, C. R.; KESSLER, R. H.; ARAÚJO, F. R.; ROSINHA, G.; CRIADO-FORNELIO, A.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. Comparison of semi-nested PCR and real time PCR for detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle. **Parassitologia**, v. 49, supl. 1, p. 99, 2007.

OLIVEIRA, A. A.; DE PEDREIRA, P. A. S.; ALMEIDA, M. F. R. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasmosse no estado de Sergipe. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, n. 5, p. 377-386, 1992.

OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. Aspectos epidemiológicos da babesiose bovina em São Carlos, SP. Comunicado Técnico Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 6p., n. 49, jun. 2004. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacao-gratuita/boletim-de-pesquisa-desenvolvimento>> Acesso em: 03 nov 2010.

OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA, H. N.; REGITANO, L. C. A.; ALENCAR, M. M.; NÉO, T. A.; SILVA, A. M. Estudo da infecção *Babesia bigemina* em bovinos de corte e carrapatos. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 26p., dez. 2007. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacao-gratuita/boletim-de-pesquisa-desenvolvimento/boletim12.pdf/view>> Acesso em: 03 nov 2010.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; OLIVEIRA, M. C. S.; ARAUJO 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, n. 1, p. 105–111, 2005.

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

PACHECO, R. C.; VIDOTTO, O.; TAMEKUNI, K.; IGARASHI, M.; KAWASAKI, P.; PRUDÊNCIO, L. B.; MARANA, E. R. M., LUZ PEREIRA, A. Dinâmica da infecção natural pelo *Anaplasma marginale* em vacas e bezerros da raça Holandesa, na região de Londrina, estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 3, p. 235-244, 2004.

PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F. R.; MCELWAIN, T.F. Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 631–635, 2001.

PARKER, J. L.; WHITE, K. W. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. **Cornell Veterinary**, v. 82, n. 3, p. 253-274, 1992.

PATARROYO, J.H., VARGAS, M.I., BICUDO, P.L. Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 11, n. 4, p. 301-308, 1982.

PATARROYO, J. H.; HENCKEL, D. J.; PRATES, A. A.; MAFRA, C. L. Antigenic profile of a pure isolate of *Anaplasma marginale* of Brazilian origin, using a Western blot technique. **Veterinary Parasitology**, v. 52, n. 1-2, p. 129-137, 1994.

PATARROYO, J. H., VARGAS, M. I., RIBEIRO, M. F. B.; SANTOS, J. L.; FARIA, J. E. *Anaplasma marginale*: ultraestrutura de uma amostra de origem brasileira. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, n.4, p. 839-847, 1987.

PENZHORN, B. L. Babesiosis of wild carnivores and ungulates. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 11–21, 2006.

PEREIRA, M. A. Dinâmica da infecção por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bezerras de propriedades leiteiras da microrregião de Lavras, Sul

de Minas Gerais. 2006. 71 f. Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

PFISTER, H. W.; WILSKÉ, B.; WEBER, K. Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. **The Lancet**, v. 343, n. 8904, p. 1013-1016, 1994.

POST, J. E.; SHAW, E. E.; WRIGHT, S. Suspected borreliosis in cattle. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 539, n. 1, p. 488, 1986.

POSTIC, D.; RAS, N. M.; LANE, R. S.; HENDSON, M.; BARANTON, G. Expanded diversity among Californian *B. burgdorferi* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3497–3504, 1998.

POSTIC, D.; GARNIER, M.; BARANTON, G. Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates—description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, n. 4, p. 263–271, 2007.

RAJPUT, Z. I.; HU, S.; ARIJO, A. G.; HABIB, M.; KHALID, M. Comparative study of *Anaplasma* parasites in tick carrying buffaloes and cattle. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 6, n. 11, p. 1057–1062, 2005.

RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R.; SOUZA, I. I. F.; OLIVEIRA, R. H. M.; ELISEI, C.; SOARES, C. O.; SACCO, A. M. S.; ROSINHA, G. M. S.; ALVES, L. C. Molecular and antigenic characterisation of ribosomal phosphoprotein P0 from *Babesia bovis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 998-1002, 2009.

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

REDDY, G. R.; MORE, T.; SHARMA, S. P.; SINGH, L. N. The oxidant defense system in water-buffaloes (*Bubalus bubalis*) experimentally infected with *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 27, n. 3-4, p. 245-249, 1988.

RIBEIRO, M. F. B.; REIS, R. Prevalência da Anaplasmose em quatro regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 57-62, 1981.

RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D.; GUIMARÃES, A. M.; SCATAMBURLO, M. A.; MARTINS N. E. Transmissão congênita da anaplasmose bovina. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 47, n. 3, p. 297- 304, 1995.

RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 61, n. 1, p. 31- 39, 1996.

RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F.; GUIMARÃES, A. M. Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 70, n. 4, p. 271-277, 1997.

RICH, S. M.; ARMSTRONG, P. M.; SMITH, R. D.; TELFORD III, S. R. Lone star tick-infecting *Borrelia* are most closely related to the agent of bovine Borreliose. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 494-497, 2001.

RICHEY, E. J. Bovine anaplasmosis. In: HOWARD, R.J. (Ed.), **Current Veterinary Therapy Food Animal Practice**. Philadelphia: THE W.B. SAUNDERS CO., 1981. p. 767-772.

RICHTER, D.; POSTIC, D.; SERTOUR, N.; LIVEY, I.; MATUSCHKA, F. R.; BARANTON, G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 873-881, 2006.

RISTIC, M. Anaplasmosis. In: WEINMAN, D.; RISTIC, M. **Infectious Blood Diseases of Man and Animals**. vol. 2. Academic Press, New York: London, 1968. p. 473-542.

RISTIC, M., Bovine anaplasmosis. In: KREIER, J. P. **Parasitic Protozoa**. vol. 4. Academic Press, New York: London, 1977. p. 235-249.

ROBERTS, R. H.; LOVE, J. N. Infectivity of *Anaplasma marginale* After Ingestion by Potential Insect Vectors. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 10, p. 1629-1630, 1977.

ROCHA, U. F.; SERRA, O. P.; GROCK, R.; SERRA, R. G. Infestação natural de búfalos – *Bubalus bubalis* L., 1758 – dos estados de São Paulo e de Minas Gerais, Brasil, por *Boophilus microplus* (Canestrini, 1997) e por *Anocentor nitens* (Neumann, 1897), Acari, Ixodidae. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, n. 4, p. 197-199, 1969.

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

ROGERS, A. B.; SMITH, R. D.; KAKOMA, I. Serologic cross-reactivity of antibodies against *Borrelia theileri*, *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia coriacea* in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 6, p. 694-697, 1999.

ROSA, B. R. T.; FERREIRA, M. M. G.; AVANTE, M. L.; FILHO, D. Z.; MARTINS, I. S.; PICCININ, A. Introdução de búfalos no Brasil e sua aptidão leiteira. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, v. 4, n. 8, 2007. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em: 13 nov. 2010.

ROYCHOUDHURY, G. K.; GAUTAM, O. P. Experimental studies on the pathogenicity of *Babesia bigemina* in buffalo calves. **Tropical animal Health and Production**, v. 11, n. 2, p. 91-93, 1987.

RUDENKO, N.; GOLOVCHENKO, M.; GRUBHOFFER, L.; OLIVER JR, J. H. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex



from the southeastern region of the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 134–141, 2009a.

RUDENKO, N.; GOLOVCHENKO, M.; LIN, T.; GAO, L.; GRUBHOFFER, L.; OLIVER JR, J. H. Delineation of a New Species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato Complex, *Borrelia americana* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 3875–3880, 2009b.

RUIZ, P. M. G.; PASSOS, L. M. F.; MACHADO, R. Z.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection of IgM Antibodies to *Babesia bigemina* in Cattle. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 2, p. 237-240, 2001.

RUIZ, P. M. G.; PASSOS, L. M. F.; MARTINS, M. S.; PATARROYO, J. H.; RIBEIRO, M. F. B. Antigenic characterization of morphologically distinct *Anaplasma marginale* isolates using a panel of monoclonal antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. X, p. 169-177, 2002.

SACCO, A. M. S.; KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R. Cepas atenuadas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e de *Anaplasma centrale* como imunógenos no controle da tristeza parasitária bovina. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 849-855, 2001.

SAL, M. S.; LI, C.; MOTALAB, M. A.; SHIBATA, S.; AIZAWA, S.; CHARON, N. W. *Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook-basal body structure. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 6, p. 1912–1921, 2008.

SALLES, R. S.; FONSECA, A. H.; SCOFIELD, A.; MADUREIRA, R. C., YOSHINARI, N. H. Sorologia para *Borrelia burgdorferi* *latu sensu* em equinos no estado do Rio de Janeiro. **A Hora Veterinária**, v. 22, n. 127, p. 46-49, 2002.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463- 5467, 1977.

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. **Veterinária e Zootecnia**, v. 4, n. 1, p. 25-33, 1992.

SCHILD, A. L.; RUAS, J. L.; FARIAS, N. A.; GRECCO, F. B.; SOARES, M. P. Aspectos epidemiológicos de um surto de babesiose cerebral em bovinos em zona livre de carrapato. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2646-2649, 2008.

SCHUNTNER, C. A.; LEATCH, G. Radioimmunoassay for *Anaplasma marginale* antibodies in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 4, p. 504-507, 1988.

SCOFIELD, A.; MARQUES, C. C.; BARBOSA, J. D.; FONSECA, A. H. Ocorrência de *Borrelia* sp. em búfalo (*Bubalus bubalis*) no município de Castanhal, estado do Pará. In: V CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA. 2005, Búzios. **Anais...Búzios: 2005**. p. 130.

SHARMA, S. P. Characterization of *Anaplasma marginale* infection in buffaloes. **The Indian Journal of Animal Sciences**, v. 57, n. 2, p. 76-78, 1987.

SHARMA, S. P.; AMANFU, W.; LOSHO, T. C. Bovine borreliosis in Botswana. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 3, p. 221-223, 2000.

SHIMADA, M. K.; YAMAMURA, M. H.; KAWASAKI, P. M.; TAMEKUNI, K.; IGARASHI, M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in Larvae of *Boophilus microplus* Ticks by Polymerase Chain Reaction. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 1026, n. 1, p. 95-102, 2004.

SILVA, V. M. G.; ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R. M.; 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. A. A. Comparison between indirect enzyme-linked immunosorbent assays for *Anaplasma marginale* antibodies with recombinant major surface protein 5 and initial body antigens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 511-516, 2006.

SILVA, M. A. M.L; RONCONI, A.; CORDEIRO, N.; BOSSI, D. E. P.; BERGALLO, H. G.; COSTA, M. C. C.; BALIEIRO, J. C. C.; VARZIM, F. L. S. B. Blood parasites, total plasma protein and packed cell volume of small wild mammals trapped in three mountain ranges of the Atlantic Forest in Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 3, p. 531-535, 2007a.

SILVA, R. A.; CORRÊA, F. N.; BOTTEON, R. C. C. M.; BOTTEON, P. T. L. Infecção Natural por Hemoparasitos em bezerros submetidos à quimio-profilaxia aos 30 dias de idade. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 163 - 165, 2007b.

SINGH, H., MISHRA, A. K., RAO, J. R., TEWARI, A. K. Seroprevalence of babesiosis in cattle and buffaloes by indirect fluorescent antibody test. **Journal of Veterinary Parasitology**, v. 21, n. 1, p. 1-4, 2007.

SMITH, T.; KILBORNE, F. L. **Investigation into the nature causation and prevention of Texas or Southern cattle fever**. Bulletin 1. Washington: USDA, 1893. 301 p.

SMITH, R. D.; BRENER, J.; OSORNO, M.; RISTIC, M. Pathobiology of *Borrelia theileri* in the tropical cattle tick, *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 32, n. 2, p. 182-190, 1978.

SMITH, R. D.; MIRANPURI, G. S.; ADAMS, J. H.; AHRENS, E. H. *Borrelia theileri*: Isolation from ticks (*Boophilus microplus*) and tick-borne transmission between splenectomized calves. **American Journal Veterinary Research**, v. 46, n. 6, p. 1396-1398, 1985.

SMITH, R. D.; ROGERS, A. B. *Borrelia theileri*: A review. **Journal of Spirochetal and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 4, p. 63-68, 1998.

SOARES, C. O.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; MANERA, G. B.; SCOFIELD, A.; YOSHINARI, N. H. Sorologia para borreliose em cães procedentes da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 111-114. 1999.

SOARES, C. O.; ISHIKAWA, M. M.; FONSECA, A. H.; YOSHINARI, N. H. Borrelioses, agentes e vetores. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 1-19, 2000a.

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 região Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 75-79, 2000b.

SOOD, S. K.; ZEMEL, L. S.; ILOWITE, N. T. Interpretation of immunoblot in pediatric Lyme arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 22, n. 4, p. 758-761, 1995.

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

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; SCOFIELD, A.; MADRUGA, C. R.; CUNHA, N. C.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *Babesia bigemina* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 26-30, 2000b.

SOUZA, A. P.; SURKAMP, V.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; FARIAS, L. M. Prevalência de anticorpos anti-*Babesia* em bovinos no planalto norte de Santa Catarina. **Revista de Ciência Agroveterinária**, v. 1, n. 1, p. 21-23, 2002.

STARCOVICI, C. Bemerkungen u̇ber den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krakheiten, die seuchenhafte Hȧmoglobinurie des Rindes (Babes), dans Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). **Zbl. Bakt., I. Abt.**, v. 14, p. 1-8, 1893.

STARKE, W. A.; ROCHA, U. F.; MACHADO, R. Z.; ZOCOLLER, M. C. Prevalence and intensity of infestation by *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), under natural conditions, in buffalos in Mato Grosso do Sul State, Brazil. In: CONFERENCE OF THE WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 1985, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1985. p. 10.

STARKE, W. A.; EVANGELISTA, F. M. M.; ZOCOLLER, M. C. Comparative study of the natural infestation by *Boophilus microplus* tick between buffalo and cattle. In: WORLD BUFALLO CONGRESS, 1994, São Paulo. **Anais...**São Paulo: 1994. p. 102, 1994.

STEERE, A. C.; MALAWISTA, S. E.; HARDIN, J. A.; RUDDY, S.; ASKENASE, P. W.; ANDINAN, W. A. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. **Annals of Intern Medicine**, v. 86, n. 6, p. 685, 1977a.

STEERE, A. C.; MALAWISTA, S. E.; SNYDMAN, D. R.; SHOPE, R. E.; ANDINAN, W. A.; ROSS, M. R.; STEERE, R. M. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. **The Arthritis Rheumatology**, v. 20, n. 1, p. 7, 1977b.

STEERE, A. C.; GRODZICKI, R. L.; KORNBLATT, A. N. The spirochaetal etiology of Lyme disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 308, n. 13, p. 733-740, 1983.

STEERE, A. C. Lyme disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 2, p. 115-125, 2001.

STICH, R.W.; KOCAN, K. M.; PALMER, G. H.; EWING, S. A.; HAIR, J. A.; BARRON, S. J. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. **The American Journal Veterinary Research**, v. 50, n. 8, p. 1377-1380, 1989.

STEVENSON, B.; EL-HAGE, N.; HINES, M.; MILLER, J.; BABB, K. Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface proteins: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 491-497, 2002.

SUAREZ, C. E.; PALMER, G. H.; JASMER, D. P.; HINES, S. A.; PERRYMAN, L. E.; MCELWAIN, T. F. Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 46, n. 1, p. 45-52, 1991.

SUAREZ, C. E.; MCELWAIN, T. F.; ECHAIDE, I.; TORIONI DE ECHAIDE, S. T.; PALMER, G. H. Interstrain conservation of *Babesia* RAP-1 surface-exposed B-cell epitopes despite rap-1 genomic polymorphism. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 8, p. 3576-3579, 1994.

SUAREZ, C. E.; PALMER, G. H.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; HINES, S. A.; HOTZEL, I.; MCELWAIN, T. F. Organization, transcription, and expression of rhostry associated protein genes in the *Babesia bigemina* rap-1 locus. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 101-112, 2003.

SWELLENGREBEL, N. H. Sur la cytologie comparée des spirochètes et des spirilles. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 21, p. 562-586, 1907.

TEBELE, N.; PALMER, G.H. Crossprotective immunity between the Florida and a Zimbabwe stock of *Anaplasma marginale*. **Tropical Animal Health Production**, v. 23, n. 4, p. 197-202, 1991.

THEILER, A. *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.): the marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. Report of the Government Veterinary Bacteriologist for the year 1908-1909. Pretoria : Government Printing and Stationary Office, 1910. 7-64 p.

THOEN, C. O.; BLACKBURN, B.; MILLS, K.; LOMME, J.; HOPKINS, M. P. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in cattle in a herd in which anaplasmosis was diagnosed. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 499-502, 1980.

TORINA, A.; AGNONE, A.; SIRECI, G.; MOSQUEDA, J. J.; BLANDA, V.; ALBANESE, I.; LA FARINA, M.; CERRONE, A.; CUSUMANO, F.; CARACAPPA, S. Characterization of the Apical Membrane Antigen-1 in Italian Strains of *Babesia bigemina*. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, n. 1-2, p. 52-56, 2010.

TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D. P.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; SUAREZ, C. E.; MCELWAIN, T. F. Detection of Cattle Naturally Infected with *Anaplasma*

*marginale* in a Region of Endemicity by Nested PCR and Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 777-782, 1998.

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

UILENBERG, G. Highlights in recent research on tick-borne disease of domestic animals. **The Journal of Parasitology**, v. 72, n. 4, p. 485-491. 1986.

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

VIDOTTO, O.; ANDRADE, G. M.; AMARAL, C. H. S.; BARBOSA, C. S.; FREIRE, R. L.; ROCHA, M. A.; VIDOTTO, M. C. Frequência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da região de Londrina, Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 45, n. 5, p. 655-659, 1997.

VIDOTTO, M. C.; VIDOTTO, O.; ANDRADE, G. M.; PALMER, G.; MCELWAIN, T.; KNOWLES, D. P. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in cattle in Paraná State, Brazil, by MSP-5 competitive ELISA. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 849, n. 1, p. 424-426, 1998.

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

VISSER, E. S.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; DAVIS, W. C.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; KNOWLES, D. P. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 12, p. 5139-5144, 1992.

VIVAS, R. I. R.; AGUILAR, F. C.; ALPIZAR, J. L. D.; GALERA, L. A. C.; CALDERÓN, J. J. S. Detección de espiroquetas del género *Borrelia* en hemolinfas de teleoginas de *Boophilus microplus* en el estado de Yucatán, México. **The Veterinaria México**, v.27, n. 2, p. 187-188, 1996.

WANG, G.; VAN DAM, A. P.; LE FLECHE, A.; POSTIC, D.; PETER, O.; BARANTON, G.; DE BOER, R.; SPANJAARD, L.; DANKERT, J. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 926-932, 1997.

WELLS, S. J.; TRENT, A. M.; ROBINSON, R. A.; KNUTSON, K. S.; BE, R. F. Association between clinical lameness and *Borrelia burgdorferi* antibody in dairy cows. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 3, p. 398-405, 1993.

WILKOWSKY, S. E.; FARBER, M.; ECHAIDE, I.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; ZAMORANO, P. I.; DOMINGUEZ, M.; SUAREZ, C. E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. *Babesia bovis* merozoite surface protein-2c (MSA-2c) contains highly immunogenic,

conserved B-cell epitopes that elicit neutralizationsensitive antibodies in cattle. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 133-141, 2003.

WILLADSEN, P. Mechanisms and genetics of host resistance to ticks. In: PROC. 3RD WORLD CONGRESS GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 1986, Lincon. Anais...Nebraska, 1986. p. 571-580.

WILSKE, B.; HABERMANN, C.; FINGLERLE, V.; HILLENBRAND, B.; JAURIS-HEIPKE, S.; LEHNERT, G.; PRADEL, I.; ROSSLER, D.; SCHOULTE-SPECHTEL, U. An improved recombinant IgG immunoblot for diagnosis of Lyme Borreliosis. **The Medicine Microbiology and Immunology**, v. 188, n. 3, p. 139-144, 1999.

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, supl. 1, p.11-13, 1989.

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

YOSHIHARA, E.; VIDOTTO, O.; YAMAMURA, M. H.; MARANA, E. R. M.; PACHECO, R.; SILVEIRA, A. P. Studies of natural infection with *Anaplasma marginale* in nelore cattle in the Umuarama municipality, Parana State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 21-26, 2003.

YOSHINARI, N. H.; STEERE, A. C.; COSSERMELLI, W. Revisão de borreliose de Lyme. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 34-37, 1989.

YOSHINARI, N. H.; OYAFUSO, L. K.; MONTEIRO, F. G. V.; BARROS, P. J. L.; CRUZ, F. C. M.; FERREIRA, L. G. E. BONASSER, F.; BAGGIO, D.; COSSERMELLI, W. Doença de Lyme: Relato de um caso observado no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 170-174, 1993a.

YOSHINARI, N. H.; STEERE, A. C.; BARROS, P. J. L.; CRUZ, F. M. C.; MENDONÇA, M.; OYAFUSO, L. K.; LEVY, L.; COSSERMELLI, W. Lyme disease in Brazil: report of five cases. **Revista Espanhola de Reumatologia**, v. 20, supl. 1, p. 6, 1993b.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; BONOLDI, V. L. N.; ISHIKAWA, M.; BATTESTI, D. M. B.; PIRANA, S.; FONSECA, A. H.; SCHUMAKER, T. T. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 111-117, 1997.

YOSHINARI, N. H.; SOARES, C. O. FONSECA, A H.; SCOFIELD, A.; BATTESTI, D. B.; MADRUGA, C. R. Serology for *Babesia bovis* in human patients with Lyme-like disease syndrome, syphilis, septicemia and autoimmune diseases. In: XXI INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 2000, Foz do Iguaçu. **Annals...**Foz do Iguaçu: 2000. p. 820-820.

YOSHINARI, N. H.; ABRÃO, M. G.; BONOLDI, V. L.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; SCOFIELD, A.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Coexistence of antibodies to tick-

borne agents of babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia county, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 311-318, 2003.

YOSHINARI, N. H.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V. L. N.; MARANGONI, R. G.; GAUDITANO, G. Doença de Lyme-símile brasileira ou Síndrome Baggio-Yoshinari: zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 363-369, 2010.

ZARLENGA, D. S.; HIGGINS, J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 3-4, p. 215-230, 2001.

ZAUGG, J. L.; GOFF, W. L.; FOREYT, W.; HUNTER, D. L. Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *A. ovis*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 32, n. 1, p. 62-66, 1996.

ZBINDEN, R.; GOLDENBERGER, D.; LUCCHINI, G. M.; ALTWEGG, M. Comparison of two methods for detecting intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi*-specific antibodies and PCR for diagnosis of Lyme antibodies and PCR for diagnosis of Lyme neuroborreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1795-1798, 1994.

ZHAN, L.; CHU, C.; ZUO, S.; WUA, X.; DUMLER, J. S.; JIA, N.; JIANG, B.; YANG, H.; CAO, W. *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in rabbits from southeastern China. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 3-4, p. 354-356, 2009.

ZHONGLING, L., JUNLONG, Z. LIHUA, M.; BAOAN, Y. Studies on buffalo babesioses in Hubei Province, China. **Tropical Animal Health and Production**, v. 29, supl. 4, p. 33S-36S, 1997.

## ANEXOS

### Anexo A. Soluções para o ELISA Indireto.

#### **Tampão Salino Fosfatado (PBS) [10x] pH 7,4 (Solução de Estoque)**

NaCl-----	80,0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	2,0g
KCl-----	2,0g
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <u>ou</u> -----	9,4g
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 12(H <sub>2</sub> O) <u>ou</u> -----	29,0g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7(H <sub>2</sub> O)-----	17,8g

#### **Tampão Carbonato pH 9,6**

	<b>500mL</b>	<b>1L</b>
<u>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></u> -----	0,80g-----	1,59g
<u>NaHCO<sub>3</sub></u> -----	1,47g-----	2,93g

#### **Tampão Glicina pH 10,5**

	<b>500mL</b>	<b>1L</b>
Glicina-----	3,75g-----	7,51g
ZnCL <sub>2</sub> -----	0,68g-----	1,36g
MgCl <sub>2</sub> .6(H <sub>2</sub> O)-----	0,1g-----	0,2g



**Anexo B.** Distribuição das coletas de sangue para obtenção de soro bubalino entre as microrregiões do estado do Rio de Janeiro, realizadas de 06/2008 a 12/2009, e suas respectivas mesorregiões, municípios visitados, número de propriedades contatadas, número de animais observados e número de animais em que foi possível realizar coleta de material por município.

Mesorregião	Microrregião	Município	Nº de Propriedades contatadas	Total de búfalos	Nº obtido de amostras	
Noroeste Fluminense	Sto. Antônio de Pádua	Miracema	1	115	14	
Norte Fluminense	Campos Goytacazes	Campos Goytacazes	2	200	34	
	Macaé	Macaé	1	82	11	
Centro Fluminense	Cantagalo-Cordeiro	Cantagalo	1	21	9	
Baixadas	Bacia de São João	Casimiro de Abreu	1	1000	65	
		Rio das Ostras	1	200	9	
	Lagos	Araruama	1	450	28	
Sul Fluminense	Vale do Paraíba Fluminense	Rio Claro	2	70	49	
	Barra do Piraí	Barra do Piraí	1	8	4	
Metropolitana do RJ	Vassouras	Vassouras	1	37	4	
	Serrana	Teresópolis	1	185	24	
	Macacu-Caceribu	Cachoeiras de Macacu	1	49	15	
	Itaguaí	Itaguaí	1	26	26	
	Rio de Janeiro		Itaboraí	1	17	4
			Rio de Janeiro	1	1000	20
<b>Total</b>			<b>17</b>	<b>3063</b>	<b>316</b>	

**Anexo C** Distribuição das coletas de sangue para obtenção de DNA bubalino entre as microrregiões do estado do Rio de Janeiro, realizadas de 06/2008 a 12/2009, e suas respectivas mesorregiões, municípios visitados, número de propriedades contatadas, número de animais observados e número de animais em que foi possível realizar coleta de material por município.

Mesorregião	Microrregião	Município	Nº de Propriedades contatadas	Total de búfalos	Nº obtido de amostras	
Noroeste Fluminense	Sto. Antônio de Pádua	Miracema	1	115	14	
Norte Fluminense	Campos Goytacazes	Campos Goytacazes	2	200	34	
	Macaé	Macaé	1	82	11	
Centro Fluminense	Cantagalo-Cordeiro	Cantagalo	1	21	9	
Baixadas	Bacia de São João	Casimiro de Abreu	1	1000	65	
		Rio das Ostras	1	200	9	
	Lagos	Araruama	1	450	28	
Sul Fluminense	Vale do Paraíba Fluminense	Rio Claro	2	70	30	
	Barra do Piraí	Barra do Piraí	1	8	3	
Metropolitana do RJ	Vassouras	Vassouras	1	37	4	
	Serrana	Teresópolis	1	185	24	
	Macacu-Caceribu	Cachoeiras de Macacu	1	49	15	
	Itaguaí	Itaguaí	1	26	25	
	Rio de Janeiro		Itaboraí	1	17	4
			Rio de Janeiro	1	1000	20
<b>Total</b>			<b>17</b>	<b>3063</b>	<b>295</b>	

**Anexo D** Planilha para identificação da propriedade e questionário sobre o manejo do rebanho durante as coletas.

**Data da coleta** \_\_/\_\_/\_\_

### **IDENTIFICAÇÃO**

<b>Nome do Proprietário</b>			
<b>Nome da Propriedade</b>			
<b>Município:</b>		<b>Distrito</b>	<b>Localidade</b>
<b>Acesso:</b>			
<b>Endereço para correspondência:</b>		<b>Cidade:</b>	
<b>CEP</b>	<b>TELEFONE</b>	<b>FAX</b>	<b>EMAIL</b>

### **DADOS GERAIS**

**Nº total de búfalos:** \_\_\_\_\_ **Objetivo da produção:** ( ) carne ( ) leite ( ) mista

**Sistema de criação:** ( ) extensivo ( ) semi-intensivo ( ) intensivo

**Convive com outros animais?** ( ) sim ( ) não

**Quais?** ( ) equino ( ) bovino ( ) canino ( ) aves

**Presença de animais silvestres ao redor da propriedade?** ( ) sim ( ) não

**Quais?** ( ) Capivara ( ) Gambá ( ) Pequenos roedores

( ) Outros \_\_\_\_\_

**Presença de ectoparasitas:** ( ) sim ( ) não

**Quais?** ( ) carrapatos ( ) piolhos ( ) outro \_\_\_\_\_

**Grau de infestação:** ( ) baixa ( ) moderada ( ) alta

**Usa produto ectoparasiticida:** ( ) sim ( ) não **Qual?** \_\_\_\_\_

**Frequência da aplicação:** \_\_\_\_\_

**Data da última aplicação:** \_\_/\_\_/\_\_\_\_\_

**Usa anti-helmíntico:** ( ) sim ( ) não **Qual?** \_\_\_\_\_

**Frequência da vermifugação:** \_\_\_\_\_

**Data da última vermifugação:** \_\_/\_\_/\_\_\_\_\_

**Usa outro(s) medicamento(s):** ( ) sim ( ) não

**Qual?** \_\_\_\_\_

**O(s) pasto(s) é(são) próximo de alguma mata:** ( ) Sim ( ) Não ( ) Alguns

**Observações:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

ANEXO E Planilha de identificação individual dos animais durante as coletas.

DATA DA COLETA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Nome da Propriedade: \_\_\_\_\_

**DADOS DAS AMOSTRAS**

<b>Nº DO TUBO</b>	<b>Nome/Nº do animal</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Raça</b>	<b>Infestação</b>	<b>Observações</b>