

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

DISSERTAÇÃO

Análise dos fatores de risco relacionados à resistência ao
***Rhipicephalus microplus* e à resposta imune-humoral anti-**
***Anaplasma marginale* em bovinos leiteiros**

Jenevaldo Barbosa da Silva

2012



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

**ANÁLISE DOS FATORES DE RISCO RELACIONADOS À RESISTÊNCIA
AO *Rhipicephalus microplus* E À RESPOSTA IMUNE-HUMORAL ANTI-
Anaplasma marginale EM BOVINOS LEITEIROS**

JENEVALDO BARBOSA DA SILVA

Orientado pelo professor

Dr. Aivaldo Henrique da Fonseca

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

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2012

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

JENEVALDO BARBOSA DA SILVA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM / /2012.

Aivaldo Henrique da Fonseca (Ph.D.) UFRRJ
(Orientador)

Rosangela Zacarias Machado (Ph.D.) FCAV - UNESP

Carlos Luiz Massard (Ph.D.) UFRRJ

"Senhor, dai-me serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar. Dai-me coragem para mudar as que posso mudar. Dai-me sabedoria para distinguir umas das outras."

Reinhold Niebuhr

"Cada qual livremente faz seu próprio preço, alto ou baixo, e ninguém vale se não o que se faz valer. Taxa-te, pois, livre ou escravo isso depende de ti."

Machado de Assis

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Elson Barbosa da Silva e Maria Ferreira da Silva, a meus irmãos Benevaldo Barbosa da Silva, Dirceu Barbosa da Silva, Ivânia Aparecida Barbosa da Silva, Darci Lopes Barbosa da Silva, Luciana Barbosa da Silva e Elson Barbosa da Silva Júnior, a minha namorada Gisele Maria Fagundes, que sempre me apoiaram nesta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir olhar para trás e perceber que nunca estive só e por sempre ter sido meu porto seguro nos momentos mais difíceis da minha vida.

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

A Prof^a Dr^a. Rosangela Zacarias Machado da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária (FCAV-UNESP) que além de disponibilizar o Laboratório de Imunoparasitologia, demonstrou disponibilidade e boa vontade em contribuir, tornando possível a realização deste trabalho.

A Pesq^a Dr^a. Rosane Scatamburlo Lizieire Fajardo da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro-Rio) pelo apoio incondicional durante os três anos de estudo.

Ao Doutor Charles Passos Rangel e a Doutoranda Bruna de Azevedo Baêta, pela participação na elaboração do projeto e apoio incondicional durante os três anos de coletas e análises laboratoriais.

À Prof^a. Marília Massard da Fonseca da UFRRJ, pela convivência, amizade e carinho que sempre dedica a todos os alunos orientados do professor Dr. Aivaldo.

A Prof^a Dr^a. Cristiane Divan Baldani da UFRRJ pela boa vontade em contribuir na resolução de inúmeros problemas durante as análises laboratoriais e interpretação dos dados.

A Prof^a Dr^a. Maria Julia Salin Pereira da UFRRJ pela boa vontade em sanar as dúvidas quanto ao delineamento do estudo e análise estatística.

Ao Prof. Dr. Carlos Luiz Massard da UFRRJ pela disponibilidade e paciência que tornaram prazerosa minha estadia no Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UFRRJ.

Ao Pesq. Dr. João Paulo Guimarães Soares da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Cerrados/Brasília-DF e aos Prof Dr. Carlos Henrique Machado e Dr. Carlos Elycio da Fonseca da UFRRJ pelo apoio e incentivo incondicional na realização deste e de inúmeros outros trabalhos.

Ao Prof. Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pelo apoio e boa vontade na interpretação dos resultados.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) da UFRRJ, Charles Passos Rangel, Jania de Rezende, Fábio Jorge Moreira da Silva, Antônio Amélia dos Santos Mucalane Tembue, Rafaella Câmara Teixeira, Bruna de Azevedo Baêta, Matheus Dias Cordeiro, pela amizade, convivência e colaboração.

A equipe do Laboratório de Imunoparasitologia da FCAV - UNESP, em especial à pós doutoranda Carla Roberta Freschi pelo apoio na padronização e realização do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).

A todos os funcionários da Pesagro-Rio, Estação experimental de Seropédica, que contribuíram para a realização deste estudo, em especial durante as coletas a campo.

A todos do alojamento da UFRRJ, em especial aos integrantes do quarto 532, Anderson José de Oliveira, Irinel Fernandes, Elson Barbosa da Silva Júnior, Guilherme de Oliveira Tostes, Antônio Roberto Gomes de Farias, Júnior Cesar, Jailson Silva, pela convivência e aprendizado.

Aos familiares de Flavio Henrique Vidal de Azevedo, Leonardo Barros dos Santos e Raphael dos Santos Gomes, pelo apoio durante toda o meu trajeto na UFRRJ.

Ao PPGCV da UFRRJ por fornecer infra-estrutura e material de consumo para a realização das coletas de material a campo e análise laboratorial.

Ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq) pela concessão da bolsa durante os dois anos do curso de Mestrado.

BIOGRAFIA

Jenevaldo Barbosa da Silva, filho de Elson Barbosa da Silva e Maria Ferreira da Silva, nasceu em 26 de Julho de 1984, na cidade do Varzelândia, estado de Minas Gerais, Brasil. Concluiu em dezembro de 2004 o Ensino Médio e Curso Técnico em Agropecuária no Colégio Técnico da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CTUR), localizados no município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

No ano de 2004, prestou vestibular para o curso de Zootécnia na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRRJ) e Engenharia Florestal na Universidade Federal de Viçosa (UFV), tendo sido aprovado em ambos. Optou pelo curso de Zootécnia da UFRRJ, tendo permanecido até dezembro de 2005. Em 2006 ingressou no curso de Medicina Veterinária da UFRRJ, colando grau e obtendo o título de Médico Veterinário em fevereiro de 2010.

Durante o período acadêmico realizou estágios em projetos de pesquisa no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, sendo bolsista de iniciação científica (CNPq) nível médio de agosto de 2004 a julho de 2005 e bolsista de iniciação científica (CNPq) nível superior de agosto de 2006 a fevereiro de 2010, com projetos de pesquisa na área de helmintologia, carrapatos e doenças transmitidas por carrapatos, sob a orientação do professor Adivaldo Henrique da Fonseca, Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ. Durante este período participou de 10 congressos, publicou 70 resumos em congressos e 2 trabalhos em periódicos.

Ao concluir a graduação, foi aprovado nos processos seletivos a nível de Mestrado de Ciências Veterinárias da UFRRJ (1º lugar), Ciências Veterinárias da UFV (1º lugar) e Medicina Veterinária Preventiva da UNESP – Jaboticabal (2º lugar). Em 2010 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, Área de Concentração Sanidade Animal. No Mestrado participou como colaborador na disciplina de Doenças Parasitárias (DESP-UFRRJ) e do Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD) entre a UFRRJ e UFPA. Neste projeto ministrou tópicos referentes a Verminoses, Tristeza Parasitária Bovina e Imunodiagnóstico. Durante o Mestrado participou de 4 congressos, publicou 50 resumos em congressos e 10 trabalhos em periódicos.

Em 2011 foi aprovado nos processos seletivos a nível de Doutorado na Ciências Veterinárias da UFRRJ (1º lugar) e na Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP – Câmpus de Jaboticabal) (1º lugar).

RESUMO

SILVA, Jenevaldo Barbosa. **Análise dos fatores de risco relacionados à resistência ao *Rhipicephalus microplus* e à resposta imune-humoral anti-*Anaplasma marginale* em bovinos leiteiros.** 2012. 90f Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Os objetivos do estudo foram avaliar o estado fisiológico, sazonalidade, idade, genética, número de lactações, produção leiteira, densidade de vetor e taxa de lotação como potenciais fatores de risco para a infestação pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* e a frequência de anticorpos da classe IgG contra a Rickettsia *Anaplasma marginale* em bovinos leiteiros. Foram selecionados randomicamente 80 vacas e 20 bezerras pertencentes a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro por amostragem estratificada proporcional. Os animais foram acompanhados nos anos de 2008 a 2010. A avaliação da resistência dos bovinos ao *R. microplus* foi realizada através da contagem de fêmeas ingurgitadas ou parcialmente ingurgitadas de *R. microplus*. Os dados foram transformados em $\log_{10}(2 \cdot \text{count} + 1)$. Em seguida, foram submetidos a análise da variância, testes t de Student ou Tukey e regressão linear. Para avaliar a resposta imune humoral contra *A. marginale* foi utilizado o Ensaio Imunoadsorção Enzimático Indireto. A frequência de animais soropositivos para *A. marginale* foi submetida ao teste χ^2 , e aquelas com $p < 0,2$ foram oferecidas à análise multivariada. Foram observadas altas contagens de carrapatos (36 carrapatos/animal) e redução significativa ($p < 0,01$) dos títulos de anticorpos contra *A. marginale* durante o parto. Foram considerados fatores de risco à anaplasmosose o parto (OR 2.61, IC 1.08–7.63), estado fisiológico (OR 4.5, IC 0.12–0.38), genética (OR 3.83, IC 0.08–0.28), número de lactações (OR 33.7, IC 2.14–5.16), produção leiteira (OR 3.9, IC 2.24–7.03), infestação por *R. microplus* (OR 10.3, IC 0.05–0.17) e densidade animal (OR 22.3, IC 0.05–0.17). As bezerras apresentaram prevalência de 14% ao nascer, 66% aos 12 meses e 79% aos 24 meses. A baixa soroprevalência dos bezerros recém-nascidos (OR 4.90, IC 0.13–0.31) foi consequência da baixa prevalência do agente nas vacas e não pela deficiência na transferência de anticorpos colostrais. Embora localizada em uma área de estabilidade enzoótica, a propriedade foi classificada como instável para *A. marginale*.

Palavras chave: Anaplasmosose, Carrapatos, ELISA, Periparto, Sistema imunológico

ABSTRACT

SILVA, Jenevaldo Barbosa. **Analysis of risk factors related to resistance to *Rhipicephalus microplus* and humoral immune responses against *Anaplasma marginale* in dairy cattle.** 2012. 90f Dissertation (Master in Veterinary Science, Animal health). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The study objectives were to evaluate the physiological status, seasonality, age, genetics, lactation number, milk production, vector density and stocking rate as potential risk factors for infestation by the tick *Rhipicephalus microplus* and the frequency of IgG antibodies against Rickettsia *Anaplasma marginale* in dairy cattle. For this, we randomly selected 80 cows and 20 calves belonging to the Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro through proportional stratified sampling. The animals were followed from 2008 to 2010. The evaluation of the resistance of cattle to *R. microplus* was performed by counting engorged or partially engorged females of *R. microplus*. The data were transformed into $\log_{10}(2 \cdot \text{count} + 1)$. They were then subjected to analysis of variance, Student's t test or Tukey test and linear regression. To evaluate the humoral immune response against *A. marginale* was used Indirect Enzyme-linked immunosorbent Assay. The frequency of seropositive animals for *A. marginale* was submitted to the χ^2 test, and those with $p < 0.2$ were offered to the multivariate analysis. We observed high numbers of ticks (36 ticks / animal) and a significant reduction ($p < 0.01$) antibody titers against *A. marginale* during peripartum. It were considered risk factors for anaplasmosis delivery (OR 2.61, CI 1.08-7.63), physiological status (OR 4.5, CI 0.12 – 0.38), genetics (OR 3.83, CI 0.08 – 0.28), number of lactations (OR 33.7, CI 2.14 – 5.16), dairy (OR 3.9, CI 2.24 – 7.03), infestation by *R. microplus* (OR 10.3, CI 0.05 – 0.17) and stocking density (OR 3.22, CI 0.05 – 0.17). The calves showed prevalence of 14% at birth, 66% at 12 months and 79% at 24 months. The low prevalence of newborn calves (OR 4.90, CI 0.13 – 0.31) was a consequence of the low prevalence of the agent in cows and not by a deficiency in the transfer of colostral antibodies. Although located in an area of enzootic stability, the property was classified as unstable to *A. marginale*.

Keywords: Anaplasmosis, Ticks, ELISA, Peripartum, Immune System

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Avaliação dos fatores de risco para a infestação por *Rhipicephalus microplus* em vacas no periparto por distribuição de Poisson. **25**
- Tabela 2.** Avaliação dos fatores de risco para a infestação por *Rhipicephalus microplus* em vacas de diferentes estados fisiológicos por distribuição de Poisson. **32**
- Tabela 3.** Classificação dos soros testes A/P (amostra/Positivo) em NE (Níveis de Elisa) variando de 0-9. **38**
- Tabela 4.** Avaliação dos fatores de risco para frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* por χ^2 em vacas durante o periparto, Pesagro-Rio, 2008-2010. **39**
- Tabela 5.** Modelo final da regressão logística para frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* em vacas durante o periparto, Pesagro-Rio, Brasil, 2008-2010.... **41**
- Tabela 6.** Avaliação do estado fisiológico como fator de risco para a frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* por χ^2 , Pesagro-Rio, 2008-2010. **47**
- Tabela 7.** Modelo final da regressão logística para frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* em vacas em função do estado fisiológico, Pesagro-Rio, Brasil, 2008-2010. **47**
- Tabela 8.** Avaliação dos fatores de risco para a frequência de anticorpos da classe IgG contra *Anaplasma marginale* por χ^2 , em bezerros, Pesagro-Rio, 2008-2010. **52**
- Tabela 9.** Modelo final da regressão logística para a frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* em bezerras, Pesagro-Rio, 2008-2010. **53**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Família Anaplasmataceae, com base em seqüências do gene ribossômico 16S RNA. A árvore filogenética foi construída a partir do alinhamento das seqüências pelo método Clustal W utilizando o programa MegAlign do pacote Lasergene (RIKIHISA, 2010). 5
- Figura 2.** Avaliação da associação da contagem de *Rhipicephalus microplus* adultos em vacas em função do parto, Pesagro-Rio, 2008-2010. 26
- Figura 3.** Avaliação da associação da contagem de larvas e ninfas de *Rhipicephalus microplus* em vacas em função do parto, Pesagro-Rio, 2008-2010. 26
- Figura 4.** Variação média da contagem de *Rhipicephalus microplus* em vacas paridas durante a estação seca (outono e inverno) e chuvosa (primavera e verão), Pesagro-Rio, 2008-2010. . 27
- Figura 5.** Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas durante o periparto em função do grupo genético, Pesagro-Rio, 2008-2010. 29
- Figura 6.** Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas primíparas e pluríparas, Pesagro-Rio, 2008-2010. 30
- Figura 7.** Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas de baixa, moderada e alta produção leiteira, Pesagro-Rio, 2008-2010. 31
- Figura 8.** Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas vazias, gestantes, periparto e lactantes, Pesagro-Rio, 2008-2010. 32
- Figura 9.** Variação média e desvios padrões da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas *B. taurus*, *B. indicus* e mestiças em diferentes estados fisiológicos, Pesagro-Rio, 2008-2010. 33
- Figura 10.** Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas de 1º lactação, 2º lactação e 3º ou mais lactações, diferentes estados fisiológicos, Pesagro-Rio, 2008-2010. 34
- Figura 11.** Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas de diferente potencial produtivo e estado fisiológico, Pesagro-Rio, 2008-2010. 35
- Figura 12.** Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas mantidas sob baixa, média e alta densidade animal a pasto, Pesagro-Rio, 2008-2010. 36
- Figura 13.** Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em bezerros em função da idade, Pesagro-Rio, 2008-2010. 36
- Figura 14.** Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em bezerros em função do padrão genético, Pesagro-Rio, 2008-2010. 37

Figura 15. Número de soros de vacas durante o periparto (n = 880), lactantes e secas (n=600) e bezerros (n=284) mantidas em área infestada por <i>Rhipicephalus microplus</i> , testados por iELISA contra <i>Anaplasma marginale</i> e classificadas em Níveis de Elisa (NE).....	38
Figura 16. Número de animais soropositivos para <i>Anaplasma marginale</i> durante as cinco semanas do pré-parto, semana do parto e durante as cinco semanas do pós parto, Pesagro-Rio, 2008-2010.....	42
Figura 17. Número de animais soropositivos e índices das densidades ópticas dos soros em relação ao linha de corte (DOx100/ linha de corte) obtidas do ensaio imunoenzimático indireto para <i>Anaplasma marginale</i> em vacas com secas, gestantes e lactantes, Pesagro-Rio, 2008-2010.....	46
Figura 18. Número de vacas soropositivos mantidas sob baixa, moderada e alta densidade animal, obtidos através do ensaio imunoenzimático indireto para <i>Anaplasma marginale</i> , Pesagro-Rio, 2008-2010.....	51
Figura 19. Número de animais soropositivos obtidos através do ensaio imunoenzimático indireto para <i>Anaplasma marginale</i> em vacas durante o periparto e bezerros recém nascidos, Pesagro-Rio, 2008-2010.....	55
Figura 20. Número de animais soropositivos obtidos através do ensaio imunoenzimático indireto para <i>Anaplasma marginale</i> em bezerros após a ingestão do colostro, segundo o grupo genético, Pesagro-Rio, 2008-2010.....	56

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Taxonomia de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	2
2.2 Distribuição e Epidemiologia de <i>Rhipicephalus microplus</i>	2
2.3 <i>Rhipicephalus microplus</i> como Transmissor de Agentes Patogênicos	3
2.4 Suscetibilidade de <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i> a <i>Rhipicephalus microplus</i>	3
2.5 Prevenção, Tratamento e Controle do Carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i>	4
2.6 Taxonomia de <i>Anaplasma marginale</i>	5
2.7 Ciclo Biológico de <i>Anaplasma marginale</i>	6
2.8 Transmissão de <i>Anaplasma marginale</i>	7
2.9 Imunopatologia da Anaplasmosose	7
2.10 Infecção Persistente de <i>Anaplasma marginale</i>	8
2.11 Suscetibilidade Imunológica de Vacas Durante o Periparto	10
2.12 Suscetibilidade Imunológica de Bezerros à Anaplasmosose	11
2.13 Suscetibilidade de <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i> a <i>Anaplasma marginale</i>	12
2.14 Epidemiologia da Anaplasmosose	12
2.15 Diagnóstico de <i>Anaplasma marginale</i>	14
2.16 Prevenção, Tratamento e Controle de <i>Anaplasma marginale</i>	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Local	17
3.2 Animais	17
3.3 Manejo do Rebanho Durante a Fase Experimental	17
3.3.1 Manejo Nutricional	18
3.3.2 Manejo Reprodutivo	18
3.3.3 Manejo Sanitário	18
3.4 Delineamento Experimental	19
3.5 Cálculo Amostral	19
3.5.1 Periparto	19
3.5.2 Estado fisiológico	20
3.5.3 Bezerros e novilhas	21
3.6 Métodos	22
3.6.1 Contagem de carrapatos	22
3.6.2 Coleta de amostras sanguíneas	22
3.6.3 Amostra de <i>Anaplasma marginale</i>	22
3.6.4 Sorologia	22
3.6.5 Título de anticorpos da classe IgG para <i>Anaplasma marginale</i>	23
3.7 Análise Estatística	24
3.7.1 <i>Rhipicephalus microplus</i>	24
3.7.2 <i>Anaplasma marginale</i>	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 <i>Rhipicephalus microplus</i> Durante o Periparto	25
4.1.1 Sazonalidade	27
4.1.2 Padrão racial	28
4.1.3 Número de lactações	29
4.1.4 Produção leiteira	30
4.2 <i>Rhipicephalus microplus</i> em Vacas em Diferentes Estados Fisiológicos	31
4.2.1 Padrão racial	33

4.2.2	Número de lactações.....	34
4.2.3	Produção leiteira	35
4.2.4	Densidade animal	35
4.3	<i>Rhipicephalus microplus</i> em Bezerros	36
4.3.1	Idade	36
4.3.2	Padrão racial	37
4.3	Avaliação da Resposta Imune Humoral anti- <i>Anaplasma marginale</i>	38
4.5	Títulos de Anticorpos da Classe IgG anti- <i>A. marginale</i> Durante o Periparto	39
4.5.1	Sazonalidade.....	43
4.5.2	Padrão racial	44
4.5.3	Número de lactações.....	44
4.5.4	Produção leiteira	44
4.5.5	Infestação por <i>Rhipicephalus microplus</i>	45
4.6	Títulos de Anticorpos Tipo IgG anti- <i>A. marginale</i> em Função do Estado Fisiológico	46
4.6.1	Padrão racial	48
4.6.2	Número de lactações.....	49
4.6.3	Produção leiteira	49
4.6.4	Infestação por <i>Rhipicephalus microplus</i>	50
4.6.5	Densidade animal	51
4.7	Títulos de Anticorpos Tipo IgG anti- <i>A. marginale</i> em Bezerros	51
4.7.1	Idade	53
4.7.2	Padrão racial	54
4.7.3	Infestação por <i>Rhipicephalus microplus</i>	54
4.7.4	Relação dos títulos de anticorpos nas matrizes e nos bezerros.....	55
5	CONCLUSÕES	57
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
7	ANEXOS	75
A-	Ensaio de Imunoadsorção Enzimático anti- <i>Anaplasma marginale</i>	75
B -	Soluções utilizadas no ELISA	76

1 INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1887) é o carrapato mais importante para a indústria bovina tropical (PIPER et al., 2009). Estima-se que este ixodídeo seja responsável por perdas econômicas de 13 bilhões de dólares por ano em todo o mundo (ANON, 2002). No Brasil, estes valores podem variar entre 800 milhões (MARTINEZ et al., 2006) a 2 bilhões de dólares por ano (GRISI et al., 2002). As prejuízos ocasionadas pelo *R. microplus* são principalmente pela redução da produtividade leiteira e do ganho de peso, pela danificação do couro, pelos elevados custos com acaricidas, custo com mão de obra e pela transmissão de patógenos (KUMAR et al., 2009).

Anaplasma marginale é o mais prevalente patógeno de bovinos transmitido por carrapatos em todo o mundo, ocorrendo em seis continentes e sendo responsável por grave morbidade e mortalidade em regiões temperadas, subtropicais e tropicais (PALMER, 1989). A doença é endêmica na América Latina, onde o principal vetor é o carrapato *R. microplus* (GUGLIELMONE, 1995; VIDOTTO et al., 1998). A soroprevalência de *A. marginale* varia amplamente entre os países das Américas e, a variabilidade dessa taxa contribui para o desenvolvimento de regiões geograficamente estáveis.

No Brasil, a relação entre a população do carrapato *R. microplus* com a anaplasmose bovina gera duas situações epidemiológicas: a primeira é observada nas regiões onde há uma flutuação sazonal na população de vetores, que pode ser devida às condições climáticas ou pode ser provocada por estratégias inadequadas no controle de ectoparasitas (ARAÚJO et al., 2003). Nestas condições, quando os animais estão por um longo período sem contato com *A. marginale* e se infectam, apresentam uma sintomatologia clínica aguda, com altas taxas de mortalidade. Nestes casos, a situação é denominada de instabilidade enzoótica (RIBEIRO et al., 1984). A segunda situação ocorre em áreas endêmicas, onde a população de vetores está presente durante o ano todo. Nestas regiões, os animais apresentam maior resistência à infecção, pois desenvolvem imunidade nos primeiros meses de vida, ao serem infectados por *A. marginale* quando ainda estão protegidos pelos anticorpos colostrais (ARAÚJO et al., 2003). Esta situação caracteriza áreas de estabilidade enzoótica, onde não são esperados surtos, nem altas taxas de mortalidade.

A situação epidemiológica da anaplasmose bovina, na maioria das regiões brasileiras, é de estabilidade endêmica (ARAÚJO et al., 1998). Porém, estudos soropidemiológicos têm demonstrado consideráveis variações na prevalência, com áreas de instabilidade (PAYNE; OSÓRIO, 1990), onde fatores ecológicos e climáticos não favorecem o desenvolvimento do vetor *R. microplus* e de dípteros hematófagos, transmissores de *A. marginale* (SOUZA et al., 2000b). Neste contexto, os objetivos do estudo foram conhecer potenciais fatores de risco relacionados à resistência ao *R. microplus* e a prevalência de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale* em bovinos de origem leiteira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Rhipicephalus (Boophilus) microplus foi descrito pela primeira vez por Canestrini em 1887, sendo considerada a espécie de carrapato mais importante para a bovinocultura brasileira (EVANS et al., 2000). Flechtmann (1990) citou a seguinte classificação sistemática para *B. microplus*:

Filo – Arthropoda Von Siebold; Slannius, 1845

Subfilo – Chelicerata Heymons, 1901

Classe – Aracnida Lamarck, 1802

Subclasse- Acari Leach, 1817

Ordem – Parasitiformes Renter 1909

Subordem – Metastigmata Canestrini, 1891

Ixodides Leach, 1815

Família – Ixodidae Murray, 1887

Gênero – *Boophilus* Curtice, 1891

Espécie – *Boophilus microplus* Canestrini, 1887

Porém, Murrell; Barker (2003) obsearam haver evidências consideráveis de morfologia e de seqüências de nucleotídeos entre os gêneros *Rhipicephalus* e *Boophilus*. Apesar das espécies de *Boophilus* formarem um grupo monofilético, este grupo geneticamente está incorporado no gênero *Rhipicephalus*. Atualmente o gênero *Boophilus* foi reagrupado no gênero *Rhipicephalus*. Deste modo, de acordo com a atual taxonomia *Boophilus* é sinonímia de *Rhipicephalus* (*Rhipicephalus* Koch, 1844 tem prioridade sobre *Boophilus* Curtice, 1891). Assim, a atual classificação denomina-se *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

2.2 Distribuição e Epidemiologia de *Rhipicephalus microplus*

Rhipicephalus microplus é o carrapato mais importante para a indústria bovina tropical (PIPER et al., 2009). Estima-se que este ixodídeo seja responsável por perdas econômicas de 13 bilhões de dólares por ano em todo o mundo (ANON, 2002). No Brasil, estes valores podem variar entre 800 milhões (MARTINEZ et al., 2006) a 2 bilhões de dólares (GRISE et al., 2002). Aproximadamente um bilhão de bovinos, localizados nas regiões tropicais, podem ser afetados pelo carrapato *R. microplus*, levando a perdas significativas na produção (PEGRAM et al., 1991). Nessas regiões, a infestação por esse ectoparasito, além de reduzir a produção, pode causar a morte dos animais mais suscetíveis (MARTINEZ et al., 2006).

GONZALES (1975), citou que *R. microplus* é originário da Ásia, notadamente da Índia e da Ilha de Java. As expedições exploradoras registradas pela história foram responsáveis por intensa movimentação de animais e mercadorias. Com esse transporte, ocorreu uma expansão do carrapato e sua introdução na maioria das regiões tropicais e subtropicais: Austrália, México, América Central, América do Sul e África, tendo se estabelecido dentro dos climas demarcados pelos paralelos 32° Norte e 32° Sul, com alguns focos no 35° (NUÑES et al., 1982).

Embora o teor de umidade do ar seja importante para a longevidade larval, ambientes muito úmidos não são favoráveis à sua sobrevivência, pois as tornam letárgicas, sobrevivendo por períodos mais curtos do que se estivessem em ambiente com teor de umidade mais baixo (SNOWBALL, 1957). LEWIS (1968) observou que larvas de

R. microplus podem se dispersar por longas distâncias, transportadas pelo vento, pássaros, cavalos e outros animais.

2.3 *Rhipicephalus microplus* como Transmissor de Agentes Patogênicos

Muitos patógenos como, vírus, bactérias, protozoários e riquetsias têm sido associados com a transmissão por carrapatos, incluindo vários patógenos recentemente identificados em humanos e animais domésticos (CHOMEL, 2011). Graças ao seu hábito alimentar hematófago, os carrapatos representam o primeiro grupo como fonte de patógenos transmitidos para animais e o segundo para os seres humanos, perdendo apenas para os mosquitos (SHAW et al., 2001). Nas últimas décadas, as doenças transmitidas por carrapatos recentemente identificadas ou re-emergentes com novos padrões geográficos ou prevalência têm sido descritas em todo o mundo (CHOMEL, 2011).

O primeiro registro da transmissão de agente patogênico por artrópode foi feito por Smith e Kilbourne (1893) durante a febre do gado no Texas, onde identificaram o protozoário *Babesia bigemina* como sendo transmitido pelo carrapato *Boophilus annulatus*. Atualmente, cerca de 800 espécies de carrapatos foram identificadas em todo o mundo, mas menos de 100 ocorrem na América Latina. No Brasil, apenas a espécie, *R. microplus*, com alguma frequência transmite microrganismos de importância médica aos bovinos.

Doenças transmitidas por carrapatos são fatores importantes que limitam o desenvolvimento da produção de bovinos em todo o mundo (SUAREZ; NOH, 2011). No Brasil, os parasitas *Babesia* e *Anaplasma*, são responsáveis por doenças importantes de impacto econômico, social e epidemiológico, de grande porte na bovinocultura. Embora os parasitas do gênero *Babesia* sejam protozoários apicomplexa e *Anaplasma marginale* seja uma bactéria, são historicamente ligados, uma vez que fazem parte de um complexo de doenças também conhecido como Tristeza Parasitária Bovina, compartilhando características importantes: ambos infectam exclusivamente eritrócitos nos hospedeiros vertebrados causando uma doença clinicamente aguda, são transmitidos por carrapatos *Rhipicephallus microplus* e geralmente co-ocorrem em áreas endêmicas (SUAREZ; NOH, 2011).

Sendo o controle de carrapatos a forma mais utilizada na prevenção de doenças transmitidas por carrapatos, a imunologia da interação carrapato-hospedeiro tem sido foco de inúmeros estudos em recentes anos. Em parte, isso reflete o reconhecimento da importância dos carrapatos como agentes de doenças e como vetores de patógenos de importância médica e veterinária. Além disso, reflete a falência progressiva dos meios tradicionais de controle do carrapato (WILLADSEN ; JONGEJAN, 1999).

2.4 Suscetibilidade de *Bos indicus* e *Bos taurus* a *Rhipicephalus microplus*

Bovinos demonstram grandes divergências quanto a hereditariedade fenotípica de resistência e suscetibilidade à infestação pelo carrapato *R. microplus*. Bovinos *Bos indicus* geralmente são mais resistentes à infestação de carrapatos do que os das raças *Bos taurus*, embora grandes variações na resistência podem ocorrer dentro das subespécies e dentro da raça (PIPER et al., 2010). Apesar da imunidade inata decorrente de diferenças genéticas entre raças zebuínas e taurinas ser a base do conhecimento sobre a resistência dos animais, a imunidade dos bovinos é considerada predominantemente adquirida, pois o nível de resistência em *B. indicus* se torna aparente, somente, após um período de suscetibilidade à uma infestação primária (HEWETSON, 1971).

Diferentes níveis de resistência dos bovinos ao carrapato *R. microplus*, tanto entre raças como dentro de raças foram observados em vários estudos (WHARTON et al., 1970; MORAES et al., 1986; OLIVEIRA et al., 1989). Autores como Wharton et al.

(1970) e Seifert (1971), ao estudarem a fração genética aditiva da resistência dos bovinos ao carrapato, encontraram variação genética suficiente para se acreditar na possibilidade de obtenção de considerável progresso genético pela seleção.

Tatchell e Moorhouse (1968) estudando resposta imune local de bovinos taurinos e zebuínos a infestação por *R. microplus*, mostraram que, embora as lesões provocadas pela alimentação das ninfas e dos adultos sejam semelhantes entre hospedeiros resistentes e suscetíveis, o recrutamento inicial de eosinófilos é muito maior nos hospedeiros taurinos. Os autores sugeriram que essa resposta enérgica por parte dos animais suscetíveis cria um ambiente mais favorável para o carrapato, pelo aumento de líquidos nos tecidos, mediada pelo aumento da capilaridade e permeabilidade.

Pesquisas anteriores sobre as respostas imunes de bovinos frente a infestação por carrapatos, demonstraram que esta está associada a forte reação de hipersensibilidade, sendo bovinos *B. indicus* mais resistentes aos carrapatos (SCHLEGER et al., 1976). Estes autores observaram grande infiltração de eosinófilos e elevada concentração de histamina no sítio de fixação do carrapato. Kemp; Bourne (1980) demonstraram um efeito direto da histamina em anexo larval, entretanto, observaram que a sensibilidade das larvas a histamina diminui com a estabilização dos anexos.

Os carrapatos exercem efeito negativo no ganho de peso e na produção leiteira de bovinos. Estudos estimam que os bovinos perdem cerca de 1g por cada teleóquina, sendo este efeito semelhante em *B. indicus* e *B. taurinos* (JONSSON, 2006). Porém, bovinos *B. indicus* são cinco vezes menos parasitados do que *B. taurus*, sendo razoável supor que a frequência necessária de aplicação de carrapaticida para manter uma escala da população seria de cerca de 20% do que é exigido no mesmo ambiente para o gado *B. taurus* (JONSSON, 2006).

2.5 Prevenção, Tratamento e Controle de *Rhipicephalus microplus*

Atualmente, as estratégias de controle de *R. microplus* são baseadas em produtos químicos acaricidas (SONENSHINE, 2006). No entanto, devido a problemas relacionados à resistência acaricida, aos resíduos de medicamentos no setor de carne e do leite e, aos altos custos de acaricidas, têm estimulado o desenvolvimento de métodos alternativos para permitir um controle mais eficiente (SONENSHINE et al., 2006). Estes incluem as vacinas (PATARROYO et al., 2009) e o controle biológico (SAMISH, 2001).

A vacinação se tornou uma alternativa potencialmente eficaz para controlar carrapatos e doenças transmitidas por carrapatos como demonstrado pelas vacinas comerciais Gavac® (DE LA FUENTE et al., 1998) e TickGard^{PLUS} (JONSSON et al., 2000), derivadas do antígeno Bm86 de *R. microplus*. O desenvolvimento de novas vacinas contra carrapato com maior proteção do que os derivados Bm86 até à presente data tem sido lento devido às limitações de identificação de novos antígenos (PATARROYO et al., 2009). No contexto da produção animal, as vacinas seriam uma estratégia de controle amplamente aceita, porque elas são seguras para o consumidor devido à ausência de resíduos para o hospedeiro e para o ambiente e por serem utilizadas em conjunto com qualquer outro método de controle.

Em *R. microplus* a imunidade foi obtida, após a inoculação de antígenos "escondidos" do intestino médio de carrapatos (OPDEBEECK et al., 1988) e mais tarde, com o uso de uma proteína purificada (Bm86) (WILLADSEN, 2006), ou com sua produção em massa como uma vacina recombinante (RAND et al., 1989). A vacina recombinante, já está no mercado desde 1994. Programas de vacinação foram estabelecidos, no entanto, diferentes níveis de eficácia foram encontrados devido a variação genética entre as cepas de carrapatos (SOSSAI et al., 2005).

A vacinação do gado com a proteína Bm86 recombinante reduz o número, o peso dos carrapatos ingurgitados e os índices de fecundidade. Em conjunto, estes efeitos reduzem a produção de larvas em até 90% por geração nos isolados de carrapato mais suscetíveis. Alguns isolados de campo são menos suscetíveis a vacina, embora, na Austrália, pelo menos, este efeito não foi inaceitavelmente grande. Com a vacina recombinante, os maiores efeitos ocorrem sobre a fecundidade das fêmeas. Em termos práticos, isto significa que o controle das populações de carrapatos é mais evidente depois de pelo menos uma geração de carrapatos, devendo ser evitada a re-introdução contínua de carrapatos no rebanho. Com a utilização do antígeno Bm86, os títulos de anticorpos não são impulsionados pelas re-infestações de carrapatos, assim para o controle do carrapato são necessárias doses de reforço anuais.

2.6 Taxonomia de *Anaplasma marginale*

A ordem Rickettsiales foi recentemente reclassificada com base em análises dos genes 16S rRNA, groESL e proteínas de superfície maior (MSPs), sendo os organismos designados para as famílias: Anaplasmataceae e Rickettsiaceae (DUMLER et al., 2001). Dentro da família Anaplasmataceae, as análises filogenéticas foram consistentes para a formação de quatro gêneros geneticamente distintos: *Anaplasma* com similaridade mínima de 96,1%, *Ehrlichia* 97,7%, *Wolbachia* 95,6% e *Neorickettsia* 94,9% (Figura 25).

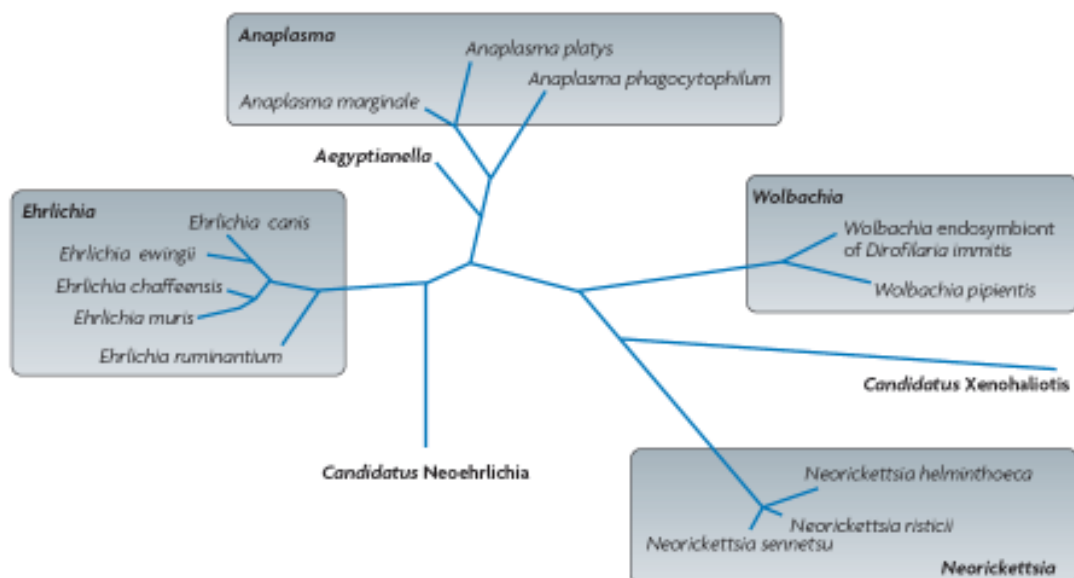


Figura 1. Família Anaplasmataceae, com base em seqüências do gene ribossômico 16S RNA. A árvore filogenética foi construída a partir do alinhamento das seqüências pelo método Clustal W utilizando o programa MegAlign do pacote Lasergene (RIKIHISA, 2010).

O gênero *Anaplasma* recentemente foi expandido para incluir três novas espécies transferidas do gênero *Ehrlichia*: *Anaplasma phagocytophilum*, que resultou da união das espécies previamente descritas como *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* e agente da ehrlichiose granulocítica humana (anaplasmose granulocítica humana), *Anaplasma bovis* (*Ehrlichia bovis*) e *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) (DUMLER et al., 2001).

Atualmente o gênero *Anaplasma* é composto por seis espécies: *Anaplasma marginale* (espécie tipo), *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocytophilum* (DUMLER et al., 2001). Estes

microrganismos são parasitas intracelulares obrigatórios, encontrados exclusivamente dentro de vacúolos ligados à membrana citoplasmática da célula do hospedeiro. Além disso, quase todos os organismos designados à família Anaplasmataceae multiplicam-se tanto em vertebrados quanto em invertebrados.

A espécie *A. marginale* foi primeiramente descrita por Theiler, 1910, na África do Sul, como “pontos marginais” em eritrócitos de bovinos doentes. As inclusões localizadas marginalmente foram observadas em células sanguíneas vermelhas de bovinos anêmicas. Após as publicações de Theiler (1910-1911), a anaplasmoze foi amplamente reconhecida na região tropical, subtropical e em muitas zonas temperadas do continente Europeu (KOCAN et al., 2010).

Smith; Kilborne (1893), em clássica publicação sobre os carrapatos como vetores da febre do gado no Texas, por engano concluíram que os "pontos marginais" observados nos eritrócitos dos bovinos anêmicos eram fases evolutivas do ciclo das babesias. Posteriormente, Theiler (1910) classificou a babesiose e a anaplasmoze como doenças distintas que podem co-existir no mesmo animal. No entanto, apenas em 1926, a co-infecção por *Babesia* e *Anaplasma* foi reconhecida nos Estados Unidos durante a febre do gado no Texas (DARLINGTON, 1926).

2.7 Ciclo Biológico de *Anaplasma marginale*

O ciclo de vida de *A. marginale* segue o ciclo alimentar do carrapato (KOCAN, 1986). Durante o repasto sanguíneo, os eritrócitos dos bovinos infectados são ingeridos pelo carrapato, promovendo a infecção das células intestinais. Após o desenvolvimento de *A. marginale* nas células do intestino médio do carrapato, muitos outros tecidos são infectados, incluindo a glândula salivar, pela qual as riquetsias são transmitidas para outros vertebrados, durante a alimentação (KOCAN, 1986; KOCAN et al., 1992a, b; GE et al., 1996). Em cada sítio de infecção no carrapato, *A. marginale*, em forma vegetativa, se desenvolve dentro de vacúolos ou colônias. Multiplica-se por divisão binária, desenvolvendo-se até a forma infectante denominada de corpúsculo denso.

A primeira forma de *A. marginale* observada dentro da colônia é a reticulada (vegetativa) que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que podem conter centenas de organismos. A forma reticulada, em seguida, evolui para a forma densa, sendo esta a forma infectante e pode sobreviver fora das células do hospedeiro por um período limitado de tempo (KOCAN et al., 2010). A sobrevivência dessas formas densas fora das células do hospedeiro permite que ocorra além da transmissão biológica, a transmissão mecânica através de fômites contaminados.

Nos bovinos o período de incubação varia de 7 a 60 dias, sendo em média 28 dias, onde a dose infectante é determinante para essa variação temporal (KOCAN et al., 2010). Uma vez no sangue do animal, o organismo penetra no eritrócito, invaginando a membrana celular de modo a formar um vacúolo, dividindo-se e formando um corpúsculo de inclusão contendo até oito corpúsculos iniciais. Após a infecção, o número de eritrócitos infectados aumenta geometricamente. Eritrócitos infectados posteriormente são fagocitados pelas células retículo-endoteliais, resultando em desenvolvimento de anemia leve a grave, hemoglobinemia e hemoglobinúria.

Os sinais clínicos incluem febre, perda de peso, aborto, letargia, icterícia e muitas vezes a morte em animais com mais de 2 anos (RISTIC, 1977). Bovinos que sobrevivem à infecção aguda desenvolvem infecções persistentes caracterizada por níveis baixos de parasitemia cíclica (KIESER et al., 1990). Animais persistentemente infectados quando expostos a um novo desafio com a mesma cepa, não desenvolvem doença clínica, pois esses permanecem imunes ao longo da vida. Porém, situações imunodepressivas podem levar esses animais a altas parasitemias e até a morte (PALMER et al., 2000).

2.8 Transmissão de *Anaplasma marginale*

A transmissão de *A. marginale* pode ser efetuada mecanicamente por moscas através da picada ou fômites contaminados com sangue e, biologicamente por carrapatos (PALMER et al., 2000; KOCAN et al., 2004a). Pesquisas recentes têm demonstrado que a transmissão biológica por carrapatos é mais eficiente do que a transmissão mecânica por moscas (SCOLES et al., 2005a). No entanto, algumas cepas de *A. marginale* não são infectantes para carrapatos, sendo a única forma de transmissão a mecânica (KOCAN et al., 2004a).

A transmissão mecânica com frequência ocorre através fômites contaminados com sangue, inclusive agulhas, serras de descornas, pinças de nariz, instrumentos de tatuagem, dispositivos para brincos auriculares e instrumentos de castração (KOCAN et al., 2010). A transmissão mecânica por artrópodes tem sido relatada em dípteros sugadores de sangue dos gêneros *Tabanus*, *Stomoxys* e várias espécies de mosquitos (EWING, 1981). Recentemente, Scoles et al. (2005a) apresentaram resultados expressivos de que na Flórida a transmissão de *A. marginale* é mais eficientemente realizada por moscas, visto que a cepa não é infectiva para os carrapatos.

A forma de transmissão mecânica é provavelmente a rota principal de transmissão para *A. marginale* em determinadas áreas dos Estados Unidos, América Central e do Sul e África, onde vetores carrapatos estão ausentes (EWING, 1981) e onde *R. microplus*, o carrapato dos bovinos nos trópicos, não parece ser um vetor biológico do agente (FIGUEROA et al., 1998).

A transmissão biológica de *A. marginale* é efetuada por cerca de 20 espécies de carrapatos (KOCAN et al., 2004a). Os principais vetores biológicos de *A. marginale* são os carrapatos *Dermacentor* spp. em áreas temperadas e *Rhipicephalus* spp. nos trópicos, embora muitas outras espécies possam estar envolvidas na transmissão (KOCAN et al., 2004a). A transmissão biológica pode ocorrer de duas formas, transestadial (a partir de um estágio para outro) e intra-estadial (dentro da mesma fase), este último realizado por carrapatos adultos machos quando se deslocam de um hospedeiro para outro (KOCAN et al., 1992a, b). Estudos demonstraram que carrapatos machos podem desempenhar um papel importante na transmissão biológica de *A. marginale* porque são persistentemente infectados com o patógeno e podem transmitir a rickettsia repetidamente por se deslocarem de um animal a outro (KOCAN et al., 1992a, b).

Rhipicephalus microplus é o carrapato mais importante para a indústria bovina mundial (PRUETT et al., 2008), pois além de seus efeitos diretos, é vetor de importantes patógenos, tais como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* (CONSTANTINOIU et al., 2010). No Brasil, o carrapato *R. microplus* é o único vetor biológico conhecido de *A. marginale* (GUGLIELMONE, 1995). Ribeiro; Lima (1996) demonstraram que um isolado brasileiro de *A. marginale* foi capaz de infectar carrapatos *R. microplus*, produzindo colônias nas células do epitélio intestinal.

2.9 Imunopatologia da Anaplasmosose

Estudos realizados por Palmer (1989), Palmer et al. (1999), Brown et al. (1998a) e Brown et al. (2001b) têm fornecido importantes informações sobre a natureza da resposta imune de bovinos à infecção por *A. marginale*, bem como a identificação de antígenos que possam desempenhar um papel na resposta imune protetora. A resposta imune a *A. marginale* envolve tanto a resposta imune humoral quanto a imunidade celular (PALMER et al., 1999).

Apesar da importância dos anticorpos na resposta imune contra *A. marginale*, é improvável que, isoladamente, esses sejam capazes de proteger os bovinos contra a

anaplasiose (BROWN et al., 2001b). Dessa forma, torna-se evidente a importância da resposta celular, a qual envolve a participação de linfócitos T auxiliares (CD4+), produtores de interferon-g (IFN-g) (BROWN et al., 1998a). Essa citocina ativa macrófagos, aumentando a produção de óxido nítrico (NO), substância que tem ação tóxica sobre riquétsias (BROWN et al., 1998a). Além disso, IFN-g atua sobre linfócitos B, estimulando a produção de IgG2 (ESTES et al., 1994). Esse isotipo apresenta maior capacidade de promover fagocitose por meio de opsonização do que a IgG1 (MCGUIRE et al., 1979), estando provavelmente envolvido no processo de neutralização da infectividade dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* mediada por anticorpos (TUO et al., 2000).

Palmer (1989) propôs que a imunização contra *A. marginale* seria efetuada por meio de anticorpos contra epítomos de superfície em combinação com a ativação de macrófagos que fagocitam eritrócitos parasitados e matam o patógeno. A peça central deste modelo seria o linfócito T CD4+ expressando INF-g, o que aumenta a síntese predominantemente da subclasse de IgG2 e concomitantemente ativa os macrófagos para aumentar a expressão do receptor, fagocitose, fusão fagolisossomal e liberação de NO.

Em contraste com a repressão imunológica generalizada observada durante a infecção por *A. phagocytophilum* em ovinos, a infecção de bovinos com *A. marginale* não resulta em alteração no número de leucócitos circulantes, incluindo linfócitos, e a imunossupressão generalizada também não tem sido relatada (GUEST, 2008). Esta importante observação sugere que, apesar de altos níveis parasitêmicos e títulos de anticorpos IgG específicos para *A. marginale*, a resposta através de célula T é difícil de ser detectada no sangue periférico (GUEST, 2008). Gale et al. (1996) mostraram que *A. marginale* induz a proliferação de linfócitos no baço de bovinos infectados, sendo que neste mesmo momento a resposta no sangue periférico não é detectável.

Brown et al. (1998a) demonstraram que a indução dessas respostas utilizando purificado de proteínas da membrana externa impede a riquetsemia por *A. marginale* após o desafio. No entanto, em uma estudo mais recente, bezerros esplenectomizados foram resistentes à anaplasiose aguda depois que linfócitos T CD4+ foram seletivamente exauridos por tratamento com anticorpos monoclonais anti-CD4 (VALDEZ et al., 2002). Por isso, apesar dos linfócitos T CD4+ desempenharem um papel na infecção por *A. marginale*, a resposta de anticorpos parece ser essencial para a defesa bem sucedida contra o parasita.

2.10 Infecção Persistente de *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale é transmitido por carrapatos ixodídeos infectados aos bovinos imunologicamente suscetíveis (PALMER, 1989). As riquétsias invadem eritrócitos maduros e se replicam intracelularmente por divisão binária. A infecção torna-se microscopicamente detectável quando a riquetsemia ultrapassa 10^7 organismos por mL de sangue. Sinais agudos da doença, caracterizados por anemia severa, ocorrem à medida que aumenta a riquetsemia para 10^9 mL⁻¹, com 10 a 70% do total de eritrócitos infectados (THEILER, 1908-1909; PALMER, 1989). Os indivíduos que sobrevivem à doença aguda permanecem persistentemente infectados por anos com níveis de riquétsias microscopicamente indetectáveis de 10^2 mL⁻¹ - 10^7 mL⁻¹ (ERIKS et al., 1989). Animais persistentemente infectados ao ser expostos a um novo desafio com a mesma estirpe, não desenvolvem doença clínica. Porém, situações imunodepressivas podem levar esses animais a altas parasitemias e até morte (PALMER et al., 2000).

A persistência da infecção ao longo da vida é fundamental para a transmissão contínua de *A. marginale*, visto que não ocorre passagem transovariana dentro do carrapato vetor. A habilidade de *A. marginale* em causar infecção persistente é propiciada

pela capacidade das proteínas de membrana externa realizarem variação antigênica, escapando assim do sistema imune do hospedeiro. A manutenção de uma população de carrapatos infectados é altamente dependente de um reservatório animal infectado (PALMER et al., 1999).

A infecção dos carrapatos através da alimentação em animais persistentemente riquetsêmicos parece ser relativamente eficiente, onde mais de 50% dos carrapatos tornam-se infectados após a alimentação (ERIKS et al., 1993). Embora a taxa de infecção do carrapato se correlacione com o nível de parasitemia durante a alimentação, uma porcentagem significativa de carrapatos se tornam infectados, mesmo quando se alimentam em animais com níveis baixos de parasitemia (ERIKS et al., 1993). Além disso, o mesmo número de *A. marginale* desenvolvem-se dentro da glândula salivar do carrapato no momento da transmissão subsequente, independentemente se infectados durante os pontos altos ou baixos da riquetsemia cíclicas que ocorre nos bovinos parasitados (PALMER et al., 2000).

Anaplasma marginale persiste em hospedeiros imunocompetentes (PALMER et al., 1999). Animais com infecção persistente são protegidos contra altos níveis riquetsêmicos e doença clínica após o desafio com a cepa homóloga (PALMER, 1989; PALMER et al., 1999). Esse paradoxo, em que a resposta imune é eficaz no controle da doença quando o animal é desafiado com doses acima de 10^8 riquétisas.mL⁻¹, mas não consegue eliminar uma infecção persistente de baixo nível, sugere que essa persistência envolve um mecanismo de escape de *A. marginale* a resposta imune do hospedeiro (PALMER et al., 2000).

A infecção de eritrócitos maduros por *A. marginale* elimina a possibilidade de que a persistência é unicamente devido à proteção contra a resposta imune na célula hospedeira, pois a vida média dos eritrócitos de bovinos de 160 dias implica a emergência contínua e re-infecção de novas hemácias para manter a infecção. Estas observações indicam que a infecção persistente deve ser um processo dinâmico caracterizado pela contínua invasão de eritrócitos e replicação (PALMER et al., 2000). A identificação de ciclos repetidos de riquetsemia, cada um composto de um aumento progressivo de organismos, seguido de uma diminuição abrupta, levou à hipótese de que a persistência da infecção reflete o surgimento seqüencial e o controle imune de variantes antigênicas (KIESER et al., 1990).

As principais proteínas de superfície (MSPs) incluem MSP1, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5, sendo as primeiras a serem identificadas com base em sua abundância e capacidade de induzir resposta imune (ARAÚJO et al., 2003). Entre as MSPs, MSP2 está envolvida na interação com células do hospedeiro vertebrado e invertebrado (DE LA FUENTE et al., 2005a) e é descrita como possível mecanismo para a infecção de novos hospedeiros ou estabelecimento da infecção persistente de *A. marginale*.

A riquetsemia aguda após a transmissão de *A. marginale* é caracterizada pela expressão de duas diferentes proteínas de membrana externa, as variantes ARV1 e ARV2 da MSP2 (RURANGIRWA et al., 1999). No entanto, a parasitemia persistente resultante é composta por organismos que não expressam ARV1 ou ARV2, mas são caracterizados por novos tipos variantes de MSP2 (RURANGIRWA et al., 1999). Estes achados suportam a hipótese de que a variação antigênica, ao invés de uma resposta imune ineficiente, é responsável pela infecção persistente de *A. marginale*. A relevância da variação antigênica das MSP2 para infecção persistente de *A. marginale* é apoiada pelas seguintes observações: i) as variantes estruturais únicas surgem em cada ciclo de parasitemia persistente; ii) os epítomos variantes específicos de células B codificados pela região hipervariável são expressos em cada ciclo, e iii) a resposta imune específica para MSP2 está associada à limpeza do organismo (PALMER et al., 2000).

A eficácia da infecção de carrapatos e o desenvolvimento de níveis elevados de formas infectantes de *A. marginale* nas glândulas salivares, juntamente com a longevidade da riquetsemia, possuem um papel fundamental para a infecção persistente e transmissão contínua (PLAMER et al., 2000). Assim, a definição da importância de bovinos com infecção persistente de *A. marginale* é fundamental para a compreensão dos determinantes essenciais da transmissão.

2.11 Suscetibilidade Imunológica em Vacas Durante o Periparto

Durante a gestação, alterações significativas ocorrem na fisiologia da fêmea, sobretudo em decorrência da transferência passiva de anticorpos para o recém-nascido (BONIZZI et al., 2003). As alterações na resposta imune da mãe durante o periparto também estão relacionadas aos produtos imunossupressivos liberados pelo feto, como fetoproteína e derivados de esteróides placentários, como a progesterona (BONIZZI et al., 2003).

Alterações hormonais na fêmea durante o parto contribuem para a baixa função imunitária neste período. Entre outros hormônios, os níveis séricos de progesterona, estrogênio e cortisol mudam dramaticamente no parto (DETILLEUX et al., 1995; VANKAMPEN; MALLARD, 1997). As tensões físicas e metabólicas da gestação, parto e lactação contribuem para a diminuição da resistência do hospedeiro e do subsequente aumento da incidência de doença (VANKAMPEN; MALLARD, 1997).

Durante o periparto ocorre imunossupressão não específica na vaca leiteira. A magnitude e a duração desta redução da imunidade dependem de muitos fatores como as práticas higiênicas e sanitárias, alimentação, habitação e diferenças genéticas (SHAFER-WEAVER et al., 1996; MALLARD et al., 1998a; ROCHE et al., 2000). O período de transição, correspondente às três semanas antes e três semanas após o parto, é extremamente importante para a saúde, produção e rentabilidade das vacas leiteiras. A maioria dos distúrbios de saúde ocorre durante este período. Assim, para uma alta eficiência reprodutiva e produtiva em vacas leiteiras faz-se necessário um período de transição livre de doenças.

Suscetibilidade as doenças infecciosas geralmente é um fenômeno multifatorial, no qual características distintas podem ser reconhecidas, entre estas está a reatividade imunológica do hospedeiro (WETTEMANN, 1980; DRACKLEY, 1999). Poucos estudos foram desenvolvidos para esclarecer a importância da flutuação nas concentrações séricas de globulina durante a lactação. Nesse estágio fisiológico ocorre uma variedade de distúrbios ocasionada pelo aumento da demanda sobre o metabolismo da vaca.

Além da gestação, fatores como estação do ano, idade, lactação e densidade de vetores também demonstraram afetar significativamente a resposta imune frente aos parasitas (BONIZZI et al., 2003). Embora alguns autores tenham observado diferenças nas concentrações séricas de globulina entre bovinos leiteiros de diferentes faixas etárias, nenhuma diferença foi associada a época ou fase da gestação. Porém, Bonizzi et al. (1989) observaram relação inversa na concentração de soroglobulinas e gestação, e correlação positiva foi encontrada entre idade e níveis séricos de globulinas. Assim, fatores como idade, sexo e densidade de vetor devem ser considerados como variáveis pré-analíticas na interpretação das concentrações de soroglobulinas em vacas de leite (MAGONA et al., 2008).

A produção do colostro acontece principalmente durante as quatro semanas que antecedem o parto, período no qual ocorre a migração das imunoglobulinas presentes na corrente sanguínea da mãe para a glândula mamária. Em bovinos de leite, provavelmente em função da especialização, foi demonstrado que a migração de imunoglobulinas séricas para a glândula mamária, durante a formação do colostro, determina uma queda de

concentração desta proteína na corrente sanguínea das vacas nas últimas semanas do pré-parto (LARSON; KENDALL, 1957; LARSON; HAYS, 1958; DIXON et al., 1961).

Moraes et al. (1997) avaliando a evolução da quantidade de soroglobulinas de fêmeas bovinas da raça holandesa no período de 28 dias do pré-parto até 28 dias do pós-parto, observaram uma queda nos níveis séricos de imunoglobulinas no período entre 14 dias antes do parto até sete dias do pós-parto. A diminuição da quantidade de imunoglobulinas no sangue das vacas durante o periparto pode ser explicada pela transferência maciça destas para o colostro no período que antecede o parto (SASAKI et al., 1976).

Brandom et al. (1971) notaram que o nível de imunoglobulinas atingiu uma máxima concentração na glândula mamária e uma máxima diminuição na circulação sanguínea materna duas a três semanas antes do parto. Porém, há relato de que a transferência máxima de imunoglobulinas da corrente sanguínea para a glândula mamária ocorre na semana pré-parto (SASAKI et al., 1976) ou três a dez dias como sugerem Wtnger et al. (1995). Essa característica pode interferir na imunidade passiva, pois vacas que sofrem pequeno período seco podem apresentar menores quantidades de imunoglobulinas em seu colostro (ROY, 1990).

Especificamente para *A. marginale*, Pacheco et al. (2004) observaram que os níveis séricos de anticorpos caíram durante o periparto e permaneceram assim por até 60 dias do pós-parto. Estes mesmos autores relataram que a intensidade da infestação por *R. microplus* não influenciou nos níveis médios de parasitemia que oscilaram entre 0,1 e 1,1%, sendo os animais considerados portadores de *A. marginale* com infecção persistente (ERIKS et al., 1989; PALMER et al., 2000).

2.12 Sucetibilidade Imunológica de Bezerros à Anaplasnose

A primeira imunidade dos recém-nascidos frente aos agentes infecciosos é a imunidade fornecida por anticorpos colostrais esta, constitui um importante fator para o estabelecimento do equilíbrio parasito-hospedeiro. Anticorpos maternos anti-*Anaplasma marginale* em bezerros desaparecem depois de 9 a 12 meses (POTGIETER; STOLTZ, 1994). Entretanto, os bezerros permanecem resistentes mais tempo do que os anticorpos transferidos passivamente (POTGIETER; STOLTZ, 1994).

Estudos de Ribeiro (1996) sobre os aspectos epidemiológicos da anaplasnose bovina em quatro regimes de manejo em Minas Gerais indicaram que esta é uma doença de característica endêmica no Estado. Ao observar o curso natural da doença em bezerros criados semi-estabulados verificou-se que todos se tornaram infectados em torno de 62 dias de idade. Os anticorpos colostrais persistiram por um período variável de 12 a 40 dias, com todos os animais apresentando parasitemia e a metade, que apresentou sintomas clínicos, curou-se espontaneamente.

Segundo levantamentos soropidemiológicos realizados no Brasil, a maioria das áreas pecuárias são caracterizadas como de estabilidade endêmica (ARAÚJO et al., 1998). Nestas áreas, bezerros são infectados pela primeira vez durante os primeiros meses de vida, quando em geral, os animais encontram-se protegidos pelos anticorpos colostrais. Porém, o manejo adotado nas propriedades, sobretudo as leiteiras, tem favorecido a ocorrência de anaplasnose nos bezerros (OLIVEIRA et al., 1992; MELO et al., 2001). A falha na transferência da imunidade passiva, ou mesmo o declínio natural dos anticorpos colostrais, associados as altas infestações por carrapatos, são fatores que devem ser considerados para a ocorrência de anaplasnose neste período (MADRUGA et al., 1985; RIBEIRO et al., 2003).

Madruga et al. (1985) observaram em seus estudos que, três dias após o nascimento 36% dos bezerros são soronegativos para anticorpos anti-*A. marginale*, com redução para

13.3% aos 15 dias de vida. As primeiras riquetsemias foram observadas a partir dos 30 dias de idade, sugerindo uma primo-infecção nos primeiros dias de vida. Neste mesmo estudo, as maiores riquetsemias foram observadas entre 60 e 120 dias de vida. Melo et al. (2001) observaram que mais de 90% dos bezerros apresentam anticorpos anti-*A. marginale* antes dos 30 dias de idade, sendo que, dos três aos cinco meses estes valores caem até atingirem um mínimo de 13,6% e a partir dos seis meses de idade, por conta da primo-infecção, mais de 96% tornam-se positivos novamente.

Os níveis de anticorpos colostrais transferidos diminuem do segundo ao quarto mês de idade, sendo que após o sexto mês todos os animais apresentam altos níveis de anticorpos para *A. marginale*, correspondendo à presença do carrapato (MADRUGA et al., 1985). Dados semelhantes foram encontrados por Madruga et al. (1987) que revelaram 79% dos bezerros com anticorpos pós-colostral no nascimento pelo ELISA, diminuindo para 13% no primeiro mês. Estes mesmos autores observaram que, durante o monitoramento do nascimento de bezerros até 210 dias de idade, detectaram diminuição dos anticorpos colostrais contra *A. marginale* em 47 dias.

2.13 Suscetibilidade de *Bos taurus* e *Bos indicus* a *Anaplasma marginale*

Desde 1912, o uso de bovinos *B. indicus* como um meio de controlar carrapatos e agentes da tristeza parasitária bovina tem sido defendido (FRANCIS, 1966), mas as evidências sobre a suscetibilidade de *B. taurus* e *B. indicus* à infecção por *A. marginale* ainda são contraditórias.

Na Austrália, Wilson et al. (1980a, b) e Otim et al. (1980) não encontraram nenhuma diferença na suscetibilidade entre as espécies *B. taurus* e *B. indicus* a *A. marginale*. Porém, Parker et al. (1985) observaram que animais zebuínos são mais resistentes a *A. marginale* do que taurinos.

O estudo de Bock et al. (1997a), no qual quatro grupos de 10 bovinos (100% de *B. indicus*, 50% de *B. indicus*, 25% de *B. taurus* e 100% de *B. taurus*) foram infectados com isolados virulentos de *A. marginale*, indicou que todos os genótipos são sensíveis à infecção por *A. marginale*. Dentre esses animais, 5/10 100% *B. indicus*, 7/10 50% *B. indicus*, 8/10 25% *B. indicus* e 10/10 100% *B. taurus* receberam tratamento contra *A. marginale*. Os autores concluíram que todas as raças de gado expostas a *A. marginale* estão em risco grave de desenvolver a doença.

Posteriormente, Bock et al. (1999c) observaram que raças *B. indicus* e *B. taurus* mantidas a pasto e infestadas com *R. microplus* infectados com um isolado virulento de *A. marginale*, não apresentaram diferença significativa na resistência à infecção por *A. marginale*. A infecção foi confirmada em esfregaços de sangue de 14 animais mestiços e nove zebuínos. Cinco bovinos mestiços e dois zebuínos necessitaram de tratamento, sendo que um *B. indicus* morreu apesar do tratamento. Houve considerável variação na resistência a *A. marginale* em indivíduos dentro de ambas as raças.

Na Austrália, há fortes indícios de que a suscetibilidade à infecção por *A. marginale* não difere substancialmente entre zebuínos e taurino, sendo ambos altamente suscetíveis à doença. Comparações utilizando cepas virulentas de origem australiana também foram descritas na África (TURTON et al., 1999) e América do Sul (GUGLIELMONE, 1995) reforçando esta opinião. Deste modo, inúmeros estudos têm concluído que *A. marginale* pode causar perdas consideráveis em ambas as raças de bovinos.

2.14 Epidemiologia da Anaplasmosose

A epidemiologia da anaplasmosose bovina envolve aspectos que ainda permanecem obscuros, principalmente devido ao fato de que a transmissão de *A. marginale*, em

condições naturais, não é bem definida (GUGLIELMONE, 1995). *Anaplasma marginale* é o mais prevalente patógeno de bovinos transmitido por carrapatos em todo o mundo, ocorrendo em seis continentes e sendo responsável pela grave morbidade e mortalidade em regiões temperadas, subtropicais e tropicais (PALMER, 1989).

A doença é endêmica na América Latina, onde o principal carrapato é *R. microplus* (GUGLIELMONE, 1995; VIDOTTO et al., 1998), com exceção das zonas desérticas e montanhosas, como os Andes (GUGLIELMONE, 1995). A soroprevalência de *A. marginale* varia amplamente entre os países das Américas e, a variabilidade dessa título contribui para o desenvolvimento de regiões geograficamente estáveis.

No Brasil, a relação entre a população de *R. microplus* e dípteros com a anaplasnose bovina gera duas situações epidemiológicas: a primeira é observada nas regiões onde há uma flutuação sazonal na população de vetores, que pode ser devida às condições climáticas ou pode ser provocada por estratégias inadequadas no controle de ectoparasitas (ARAÚJO et al., 2003). Nestas condições, quando os animais estão por um longo período sem contato com o agente e se infectam com *A. marginale*, apresentam uma sintomatologia clínica aguda, com altas taxas de mortalidade. Nestes casos, a situação é denominada de instabilidade enzoótica (RIBEIRO et al., 1984; OLIVEIRA et al., 1992). A segunda situação ocorre em áreas endêmicas, onde a população de vetores está presente durante o ano todo. Nestas regiões, os animais apresentam maior resistência à infecção, pois desenvolvem imunidade nos primeiros meses de vida, ao serem infectados por *Anaplasma* quando ainda estão protegidos pelos anticorpos colostrais, e passam a ser portadores (ARAÚJO et al., 2003). Esta situação caracteriza áreas de estabilidade enzoótica, onde não são esperados surtos, nem altas taxas de mortalidade (RIBEIRO; REIS, 1981a; SOUZA et al., 2000).

A situação epidemiológica da anaplasnose bovina, na maioria das regiões brasileiras, é de estabilidade endêmica (ARAÚJO et al., 1998). Porém, estudos soropidemiológicos têm demonstrado consideráveis variações na prevalência, com áreas de instabilidade endêmica (PAYNE; OSÓRIO, 1990), onde fatores ecológicos e climáticos não favorecem o desenvolvimento do vetor *R. microplus* e de dípteros hematófagos, transmissores de *A. marginale* (SOUZA et al., 2000). Os estudos realizados por Souza et al. (2001), no estado do Rio de Janeiro, indicaram que nas condições epidemiológicas do estado a ocorrência de anaplasnose clínica é mínima, tornando-se necessária, apenas, a imunização de animais importados de outras áreas ou regiões de instabilidade enzoótica.

Na Europa, infecções por *A. marginale* são encontradas principalmente em países do Mediterrâneo e são endêmicas na Ásia e na África (DE LA FUENTE et al., 2005a). A distribuição da anaplasnose pode continuar a mudar, em parte como resultado do aquecimento global, que pode influenciar o movimento dos carrapatos hospedeiros (JONSSON; REID, 2000). Um exemplo da validade de tal previsão é uma confirmação do diagnóstico de anaplasnose em um rebanho de bisões no Saskatchewan, Canadá, durante o verão de 2000 (MADOFF, 2004).

Produtores em áreas endêmicas, frequentemente suspeitam de anaplasnose com base em um histórico de surtos da doença naquela localidade. Manifestações clínicas ocorrem mais frequentemente durante a estação quente e chuvosa, quando a transmissão vetorial é mais prevalente (KOCAN et al., 2010).

Bovinos sem imunidade em áreas não-endêmicas podem tornar-se infectados com *A. marginale*, após a introdução de um animal portador oriundo de uma área endêmica (SMITH et al., 1989). Da mesma forma, a infecção iatrogênica de *A. marginale* associada a equipamentos cirúrgicos contaminados ou agulhas hipodérmicas pode dar origem a casos clínicos ocorridos fora da época normal do vetor (SMITH et al., 1989).

Em uma população de animais suscetíveis, a mortalidade em decorrência da anaplasmosose é maior em animais mais velhos (KOCAN et al., 2010). Os animais mais novos adquirem a infecção e, quando manifestam sintomas clínicos, são mais resistentes do que os adultos, em virtude dos mais jovens ainda apresentarem hemoglobina fetal, o que prejudica parcialmente a multiplicação do agente no sangue e determina uma maior atividade eritropoiética da medula óssea (RISTIC, 1960) confere uma imunidade parcial. Nos animais adultos, a doença apresenta-se de forma aguda ou hiperaguda.

2.15 Diagnóstico de *Anaplasma marginale*

O diagnóstico da anaplasmosose bovina pode ser feito previamente com base na localização geográfica, estação do ano, apresentando de sinais clínicos e resultados de necropsias observadas em animais infectados (JONES et al., 1968). Para confirmar o diagnóstico, exames laboratoriais como a avaliação em microscopia de luz, esfregaços sanguíneos, testes sorológicos e métodos de diagnóstico molecular são necessários.

A anaplasmosose clínica é mais comumente encontrada em bovinos com idade superior a um ano (JONES et al., 1968). Estes autores sugeriram que vacas em estado gestacional avançado e/ou lactantes podem apresentar recaídas e desenvolver sinais de infecção aguda. Tais eventos podem ser relacionados com a imunossupressão associada ao parto em vacas (KEHRLI et al., 1989a). Anaplasmosose superaguda, caracterizada por uma alta taxa de mortalidade dentro de algumas horas de desenvolvimento dos sinais clínicos é mais frequentemente encontrada em raças de origem leiteira (RISTIC, 1977).

Os pontos mais importantes relacionados ao diagnóstico clínico de anaplasmosose são brevemente discutidos abaixo, segundo Kocan et al. (2010). Pirexia é normalmente o primeiro sinal grave da anaplasmosose e pode ocorrer antes da infecção de 1% dos eritrócitos. Febre superior a 40 °C geralmente persiste durante o período de parasitemia. O destaque da anaplasmosose clínica é a anemia associada à fagocitose de eritrócitos parasitados. A gravidade dos sinais clínicos é caracterizada pela palidez associada com o grau de anemia e pelo aumento das taxas respiratórias e batimento cardíaco. À medida que o volume celular diminui, coincidente com o aumento da parasitemia, os animais tornam-se fracos, anoréxicos e apáticos. A produção de leite diminui em vacas em lactação, vacas prenhes podem abortar e touros podem desenvolver infertilidade temporária.

A doença avança, desenvolvendo atonia gastrointestinal, estase ruminal e constipação associados à desidratação e à perda de peso. Alguns animais podem ter déficit neurológico, o qual é atribuído a episódios de anóxia cerebral. Icterícia geralmente se desenvolve mais tarde no curso da doença e é comumente observada durante o início do período convalescente.

A recuperação é mais comum em animais jovens e, em adultos são relatadas taxas de mortalidade de 50-60%. Os achados de necropsia são previsíveis a partir dos sinais clínicos e incluem anemia severa, icterícia, esplenomegalia e hepatomegalia. Hemorragias são frequentemente observadas nas superfícies serosas especialmente sobre o coração e o pericárdio, com o coração muitas vezes pálido e flácido (COETZEE et al., 2005).

Doenças que devem ser descartadas antes de fazer um diagnóstico definitivo da anaplasmosose aguda incluem antraz; leptospirose; hemoglobinúria bacilar; linfossarcoma multicêntrico; babesiose bovina; theileriose e tripanossomíase. A microscopia de luz de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa, Wright Giemsa ou Diff-Quick pode facilitar a demonstração de *A. marginale* nos eritrócitos. No entanto, esta técnica pode não ser confiável em casos avançados da doença quando os animais estão sofrendo de uma grave anemia (POTGIETER; STOLTSZ, 1994).

O ELISA indireto (iELISA) e o ELISA competitivo (cELISA) têm sido utilizados para diagnóstico de infecção por *A. marginale* em ruminantes, incluindo bovinos, ovinos e cervos (KNOWLES et al., 1996; DE LA FUENTE et al., 2004a,b). O cELISA, atualmente utilizado para o diagnóstico da anaplasmoose bovina, foi desenvolvido por Knowles et al. (1996) e é baseado na utilização de um anticorpo monoclonal (Mab) que reconhece ANAF16C1 MSP5 de *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis* (VISSER et al., 1992).

Contudo, descobertas recentes sugerem que no cELISA a partir da MSP5, comercialmente disponível por VMRD, Inc. (Pullman, WA, EUA), os anticorpos podem também reconhecer *A. phagocytophilum* em bovinos infectados (DREHER et al., 2005). A sequência MSP5 é altamente conservada e, portanto, semelhante entre cepas de *A. marginale*, bem como entre *A. centrale* e *A. phagocytophilum*. A reatividade cruzada do teste MSP5 com várias espécies de *Anaplasma* foi confirmada através da identificação de regiões comuns definidas como sendo essenciais para ANAF16C1 (MUNODZANA et al., 1998).

Um teste de ELISA indireto com base em MSP5 recombinante de *A. marginale* foi desenvolvido por Morzaria et al. (1999) e está disponível comercialmente por Svanova Biotech AB (Uppsala, Suécia), mas não foi avaliado a reatividade cruzada do ensaio com outras espécies de *Anaplasma*.

Ensaio de reação em cadeia de polimerase (PCR) para os genes MSP4 e/ou MSP1a de *Anaplasma* têm sido utilizados para diferenciar isolados de *A. marginale*, sendo de grande utilidade para rastrear a origem de surtos, e para diferenciação de espécies de *Anaplasma* como *A. marginale* e *A. centrale* (DE LA FUENTE et al., 2001a). A MSP5 expressa epítomos que são conservados entre as cepas amplamente divergentes de *A. marginale* e *A. centrale*, como *A. ovis* e até mesmo *A. phagocytophilum* (VISSER et al., 1992). Um ensaio de PCR com alvo apenas no gene MSP5, quando utilizado em populações onde os animais podem estar infectados com outros *Anaplasma* spp, podem gerar problemas significativos de especificidade. Recentemente, a PCR em tempo real (RT-PCR) foi aplicada com sucesso na detecção e quantificação de DNA de *A. marginale* (gene MSP1b) no sangue de bovinos naturalmente infectados (CARELLI et al., 2007).

Há três principais limitações para os ensaios de PCR no diagnóstico de infecção por *A. marginale*: (i) a menor sensibilidade para a detecção de infecções precoces e durante parte do tratamento quimioterápico, (ii) o custo e a necessidade de equipamentos de laboratório especializados e pessoal treinado, e (iii) a falta de validação formal nas populações-alvo (AUBRY; GEALE, 2010). Deste modo, mesmo com todos os avanços propiciados pelos métodos moleculares, os testes sorológicos com base em MSPs continuam sendo os mais práticos meios para diagnosticar infecção por *A. marginale* em um grande número de bovinos.

2.16 Prevenção, Tratamento e Controle de *Anaplasma marginale*

As medidas de controle de anaplasmoose não mudaram acentuadamente ao longo dos últimos 60 anos. As medidas variam de acordo com localização geográfica e incluem controle de artrópodes, administração profilática de antibióticos e vacinação. Controle de artrópodes não é prático em muitas áreas e só protege parcialmente contra a transmissão de *A. marginale*, que muitas vezes ocorre por transmissão mecânica através de sangue infectado (KOCAN et al., 2010). A quimioterapia, provavelmente seja menos utilizada para a prevenção de anaplasmoose no Brasil do que nos Estados Unidos, pois é cara e muitas vezes não é aplicada no gado com intervalo correto. Além disso, o uso intensivo de antibióticos leva a risco inaceitável de emergência de cepas de microrganismos resistentes.

A vacinação tem sido uma maneira econômica e parcialmente eficaz no controle da anaplasmoose bovina no mundo. A evolução e história do desenvolvimento e uso de vacinas foi avaliado por Kocan et al. (2003). As vacinas para o controle de anaplasmoose incluem dois tipos principais: viva e morta. Ambos os tipos de vacinas utilizam eritrócitos de bovinos infectados por *A. marginale* como fonte de antígeno e induzem imunidade protetora que silencia ou impede a doença clínica, mas não impede que bovinos tornem-se persistentemente infectados com *A. marginale*.

O uso de vacinas vivas para o controle de anaplasmoose foi iniciado por Sir Arnold Theiler em 1900 (THEILER, 1911). As vacinas vivas envolvem a exposição do gado através de inoculação de eritrócitos infectados com *A. centrale* ou com *A. marginale* atenuado. Outra estratégia tem sido infectar bezerras com *A. marginale* e então tratá-los com tetraciclina no início da elevação da temperatura corporal ou da detecção de parasitemia. Esse método requer um estreito monitoramento dos animais e não pode ser aplicado para grandes rebanhos. Mesmo com tratamento adequado com tetraciclina, controle das reações pós-inoculação muitas vezes não obteve sucesso na prevenção de doença aguda (KOCAN et al., 2010).

Anaplasma centrale, isolado por Sir Arnold Theiler no início dos anos 1900, é atualmente a cepa viva mais utilizada para o controle da anaplasmoose bovina (THEILER, 1911) em várias áreas do mundo, incluindo África, Austrália, Israel e América Latina. Theiler (1911) observou que *A. centrale* foi menos patogênico para bovinos do que *A. marginale* e que bovinos infectados com *A. centrale* desenvolveram proteção imune contra a infecção por *A. marginale*.

As vacinas mortas desenvolvidas nos Estados Unidos na década de 1960 foram comercializadas até 1999, quando foram retiradas do mercado. As vacinas mortas têm várias vantagens sobre as vacinas vivas, por exemplo, têm baixo risco de contaminação com doenças indesejáveis, podem ser armazenadas de forma barata e geralmente causam mínimas reações pós-inoculação. Desvantagens das vacinas mortas incluem a necessidade de reforços anuais de alto custo. Além disso, a proteção conferida pela vacina morta geralmente é inferior a da vacina viva.

O sucesso de novas vacinas para anaplasmoose utilizando tecnologias moleculares dependerá de sua capacidade de gerar proteção cruzada entre os genótipos. Muitas pesquisas foram realizadas sobre a natureza da resposta imune de bovinos para a infecção por *A. marginale*, bem como sobre a identificação de antígenos-chave que desempenham um papel na resposta imune contra *A. marginale* (PALMER, 1989; PALMER et al., 1999). A vacina ideal contra *A. marginale* seria aquela que induz imunidade protetora, evita a infecção de bovinos e viola a capacidade vetorial de carrapatos.

Por outro lado, o Dipropionato de Imidocarb tem sido utilizado por mais de 30 anos no tratamento da doença em determinados territórios (KOCAN et al., 2010). Nos Estados Unidos, o Dipropionato de imidocarb é restrito para o tratamento da babesiose canina, devido a retenção prolongada da droga em tecidos comestíveis do animal (EMEA, 2005). Clortetraciclina e oxitetraciclina são os únicos compostos aprovados para uso contra a anaplasmoose aguda nos Estados Unidos (BAYLEY, 2005). Oxitetraciclina é um derivado de tetraciclina obtido de *Streptomyces rimosus*. As tetraciclinas são drogas bacteriostáticas que funcionam através da ligação aos ribossomos e RNA mensageiro e a inibição da síntese protéica é mediada principalmente através da ligação reversível com a subunidade ribossômica 30S.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Para o estudo foi utilizado o Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) do departamento de Epidemiologia e Saúde Pública (DESP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sob responsabilidade do professor Dr. Adivaldo H. Fonseca e Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Patologia Animal (DPA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP câmpus jaboticabal, sob responsabilidade da professora Dr. Rosângela Zacarias Machado.

As observações a campo foram realizadas entre os anos de 2008 e 2010 no setor de bovinocultura de leite da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro-Rio), Estação Experimental de Seropédica (EES). A fazenda está localizada na microrregião metropolitana da cidade do Rio de Janeiro (latitude sul 22° 48', longitude oeste 43° 41', altitude de 33m).

Segundo a classificação de Köppen (KÖPPEN; GEIGER, 1928) o clima da região pertence a classe Aw, caracterizado por inverno seco e verão chuvoso e quente, com temperatura média de 24 °C, precipitação anual de 1300mm e umidade relativa do ar de 70,4%. A região tem duas estações climáticas definidas, com precipitação média no período chuvoso (outubro – março) de 979 mm e no período seco (abril – setembro) de 328 mm.

3.2 Animais

A Pesagro-Rio realiza um trabalho de melhoramento genético do plantel bovino há mais de vinte e cinco anos. Entre os anos de 2008 e 2010 o rebanho da EES apresentava-se composto por 410 animais, constituído por 280 vacas, 70 novilhas e 60 bezerras. A instituição possui animais com potencial para produzir de 1.000 a 4.000 kg de leite por lactação. No rebanho da EES são encontrados três distintos grupos de animais quanto à produção leiteira. No primeiro grupo estão os animais de alta produção, que produzem acima de 3.000 Kg de leite por lactação. No segundo grupo estão os animais com produção intermediária de 1.500 a 3.000 kg de leite por lactação. E no terceiro grupo encontram-se os animais com baixa produção, sendo esta inferior a 1.500 kg de leite por lactação.

Além da diferença quanto à faixa etária e a produção leiteira, o rebanho apresentava características distintas quanto ao padrão racial, por apresentar animais Holandês puros (*Bos taurus*), Gir puros (*Bos indicus*), Mestiços F1 ($\frac{1}{2}$ *B. taurus* x $\frac{1}{2}$ *B. indicus*) e Girolandos ($\frac{5}{8}$ *B. taurus* x $\frac{3}{8}$ *B. indicus*).

3.3 Manejo do Rebanho Durante o Estudo

O rebanho estava dividido em lotes em função da idade e do estado fisiológico dos animais. Cada lote de animais foi mantido em uma área distinta da estação experimental.

O lote de vacas secas e vazias, composto por aproximadamente 100 animais, foi mantido em uma área de 100 ha dividida em três piquetes de 33 ha. O lote de vacas secas e gestantes, composto por aproximadamente 100 animais, foi mantido em uma área de 150 ha dividida em seis piquetes de 25 ha. As vacas em lactação totalizaram 80 animais por estação e foram mantidas em uma área de 80 ha dividida em seis piquetes de 13 ha.

As bezerras de 0 a 2 meses foram mantidas em baias individuais, tendo acesso a uma área de 0,5 ha a partir dos 15 dias de idade. Entre o 3° e 6° mês, as bezerras foram mantidas durante o dia em uma área de 1,5 ha e recolhidas a noite nas baias. Entre os 7 e os 12 meses, as bezerras foram transferidas para uma área de 3 ha onde permaneceram durante o dia e a noite permaneceram em baia coletiva. Entre o 13° e 24° mês, as novilhas passaram para o sistema de pastejo contínuo em uma área de 15 ha.

3.3.1 Manejo Nutricional

As vacas foram mantidas em sistema de pastejo rotativo de *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum*, com alternância de piquetes em intervalo de tempo. Durante o período seco do ano (Abril - Setembro) os animais foram suplementados com cana-de-açúcar (*Saccharum*) e capim elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum, cv cameroon) disponibilizados no cocho. No período de lactação as vacas receberam diariamente 3kg de concentrado constituído de polpa cítrica e ração comercial com 22% de proteína bruta na proporção de 2:1.

Ao longo do ano, os animais adultos alternaram em três diferentes áreas de pastejo da EES. Este rodízio de pastagens foi estabelecido a partir do estado fisiológico dos animais. Na primeira área, denominada de Terraço e destinada ao manejo das vacas gestantes, a densidade animal foi de 1 unidade animal por hectare (1UA/ha). Na segunda área, denominada de Estação, as vacas vazias foram mantidas sob densidade animal de 2UA/ha. Enquanto na terceira área, conhecida como Estábulo, as vacas em lactação foram mantidas sob densidade animal de 5UA/ha.

As bezerras permaneceram em baias individuais nos primeiros 15 dias de vida, onde receberam 4kg de leite por dia, fornecidos em duas refeições, além da oferta de ração concentrada e água a vontade. Após a mamada da manhã todos os bezerros foram soltos em um piquete de 0,5 ha, composto de capim *Brachiaria humidicula*. Os bezerros de 1 a 15 dias de vida permaneceram no piquete somente pela manhã, retornando as baias individuais para o aleitamento. Entre o 3º e o 6º mês de idade, este grupo de bezerras permaneceu o dia todo em um piquete de 1,5ha constituído por *Brachiaria humidicula*, indo para uma baia coletiva somente no período da noite. Entre o 7º e o 12º mês de idade, os animais foram antidos em uma área de 3 há, composta de *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum*. Assim que completaram um ano de idade, estes animais foram transferidos para uma área de sistema agro-silvo-pastoril onde foram mantidos até os dois anos de idade. Após completarem dois anos, as novilhas passam a integrar o rebanho de vacas secas, quando então foram inseminadas.

3.3.2 Manejo Reprodutivo

O manejo reprodutivo incluía a inseminação artificial e duas estações de parição definidas, uma na época seca e outra na época chuvosa. Para isso, todas as vacas foram inseminadas a partir do terceiro mês de lactação. O sêmen utilizado foi adquirido da empresa especializada CRV Lagoa. A escolha do grau de sangue do touro doador foi baseada no grau de sangue da vaca, de modo a manter o rebanho com animais predominantemente mestiços (*B. taurus* x *B. indicus*). As vacas iniciaram sua vida reprodutiva aos três anos, com intervalo entre partos de 13 meses e foram mantidas em atividade até os doze anos de idade, completando em média seis lactações.

3.3.3 Manejo Sanitário

O controle de helmintos e carrapatos foi realizado a partir da aplicação de IVOMECS® (Ivermectin, 1 mg/kg, Merial, Brasil). Para o controle de hemoparasitos, os animais que apresentaram sinais clínicos de anaplasmose e/ou babesiose foram tratados com TERRAMICINA® (Oxitetraciclina, 200 mg/kg, Ouro Fino, Brasil) e IMIZOL® (Dipropionato de imidocarb, 2,1 mg/kg, Bayer, Brasil). Vacinação para Febre Aftosa foram realizadas durante o período determinado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e executados em conjunto com o Sistema de Defesa Sanitária do município de Seropédica.

3.4 Delineamento do Estudo

Foram realizados três estudos de longitudinais. No primeiro estudo foram avaliados animais adultos em diferentes estados fisiológicos. Os animais foram separados em quatro grupos distintos: vacas secas (G1), vacas gestantes (G2), vacas durante o periparto (G3) e vacas em lactação (G4). Para isso, foram acompanhados mensalmente vacas durante quatro meses. Para o segundo estudo, foram acompanhadas bezerras mensalmente durante dois anos. Por fim, para o terceiro estudo foram avaliados vacas durante o periparto. Os animais foram avaliados a cada sete dias, durante as cinco semanas anteriores ao parto, na semana do parto e nas cinco semanas posteriores ao parto.

3.5 Cálculo Amostral

O rebanho da Pesagro-Rio apresenta características heterogêneas quanto a idade, padrão racial, número de lactação, estação de nascimento e produção leiteira. Sabendo que todos esses fatores podem influenciar na infestação pelo carrapato *R. microplus* e na soroprevalência de *A. marginale*, foi utilizado o modelo de amostragem estratificada proporcionau.

Os animais foram selecionados de forma diferente para cada estudo. No primeiro estudo, foram selecionadas aleatoriamente 50 vacas para cada um dos quatro grupos avaliados. Para o segundo estudo foram selecionadas 20 bezerras. Nestes dois estudos, não foi aplicado modelo matemático para chegar ao tamanho da amostra. O tamanho da amostra foi determinado pela disponibilidade animais no rebanho.

Para o terceiro estudo, inicialmente foram selecionados por amostragem aleatória simples 50% dos animais em cada uma das duas estações de nascimentos anuais. Na tentativa de evitar erros de amostragem, optou-se por utilizar uma prevalência estimada de 50%. Assim, para o cálculo do tamanho da amostra foi utilizado um fator amostral de 0,50 (fator amostral é igual ao número de animais que pretende-se utilizar dividido pelo total de animais do plantel). Além da amostragem através de estratos foi necessário realizar uma segunda estratificação para melhor classificar o rebanho, segundo fórmula abaixo.

$$a) \% \text{ Amostra} = \frac{\text{Amostra}}{\text{População}}$$

$$b) f = n / N$$

$$c) N_1 = f \times N1$$

3.5.1 Periparto

Para a seleção dos animais que foram estudados durante o periparto foi levado em consideração o número de partos por estação do ano. De acordo o manejo reprodutivo da Estação Experimental de Seropédica (EES) da Pesagro-Rio, 80 vacas pariram durante a estação chuvosa de 2008 e 80 durante a estação seca de 2009. Assim, 80 animais randomicamente selecionados, totalizando 400 aferições no pré-parto, 80 no parto e 400 no pós parto.

- 40 vacas durante a estação chuvosa
- 40 vacas durante a estação seca

Quanto ao padrão racial as vacas foram selecionadas randomicamente da seguinte maneira:

- 15 vacas *Bos taurus* (Holandês)
- 15 vacas *Bos indicus* (Gir)
- 15 vacas $\frac{3}{8}$ *B.taurus* x $\frac{5}{8}$ *B. Indicus* (Girolando)
- 35 vacas $\frac{1}{2}$ *B.taurus* x $\frac{1}{2}$ *B. Indicus* (Meio sangue)

Quanto ao número de lactações as vacas foram selecionadas randomicamente da seguinte maneira:

- 20 vacas de 1ª lactação
- 20 vacas de 2ª lactação
- 30 vacas de 3ª lactação
- 10 vacas de mais de 4ª ou mais lactações.

Quanto ao produção leiteira por lactação as vacas foram classificadas em três categorias produtivas:

- 20 vacas com produção < 1500kg leite/ano
- 45 vacas com produção entre 1500 – 3000 kg leite/ano
- 15 vacas com produção > 3000 kg leite/ano

Quanto ao grau de infestação por *R. microplus* as vacas foram classificadas da em quatro categorias por grau de infestação:

- Ausência de carrapatos adultos, ninfas e larvas
- Infestação leve (entre 1 e 10 teleóginas e poucas larvas e ninfas)
- Infestação média (entre 11 e 30 teleóginas e média quantidade de larvas e ninfas)
- Infestação alta (acima de 31 teleóginas e muitas larvas e ninfas)

3.5.2 Estado fisiológico

Para o cálculo do número de vacas secas, gestantes e lactantes a serem acompanhadas, velou-se em consideração o tamanho do rebanho. Inicialmente, existiam 100 vacas vazias e secas. Destas foram selecionadas ao acaso 50 vacas (50% do plantel). Em cada estado fisiológico foram feitas quatro aferições de 50 animais, totalizando 200 amostras de vacas secas, 200 de vacas gestantes e 200 de vacas em lactação.

Deste modo, quanto ao padrão racial as vacas selecionadas foram estratificados em quatro grupos geneticos:

- 15 vacas *Bos taurus* (Holandês)
- 13 vacas *Bos indicus* (Gir)
- 10 vacas $\frac{3}{8}$ *B.taurus* x $\frac{5}{8}$ *B. Indicus* (Girolando)
- 12 vacas $\frac{1}{2}$ *B.taurus* x $\frac{1}{2}$ *B. Indicus* (meio sangue)

Quanto ao número de lactações as vacas foram estratificados em quatro grupos da seguinte maneira:

- 12 vacas de 1ª lactação
- 12 vacas de 2ª lactação
- 14 vacas de 3ª lactação
- 12 vacas de 4ª ou mais lactações

Quanto a produção leiteira por lactação as vacas foram classificadas em três categorias produtivas:

- 15 vacas com produção < 1500kg leite/ano
- 25 vacas com produção entre 1500 – 3000 kg leite/ano
- 10 vacas com produção > 3000 kg leite/ano

Quanto ao grau de infestação por *R. microplus* as vacas foram classificadas da em quatro categorias por grau de infestação:

- Ausência de carrapatos adultos, ninfas e larvas
- Infestação leve (entre 1 e 10 teleóginas e poucas larvas e ninfas)
- Infestação média (entre 11 e 30 teleóginas e média quantidade de larvas e ninfas)
- Infestação alta (acima de 31 teleóginas e muitas larvas e ninfas)

Quanto a densidade animal as vacas foram classificadas da em três categorias de acordo o número de unidade animal (UA) por hectare:

- Alta densidade animal (1Ua/ha)
- Média densidade animal (2UA/ha)
- Alta densidade animal (10UA/ha)

3.5.3 Bezerros e novilhas

Entre as bezerras não foi adotado nenhum modelo de amostragem, sendo simplesmente utilizado todas as 20 bezerras nascidas durante a estação chuvosa de 2008. A razão da utilização de todos os animais deve-se ao pequeno número de animais disponíveis. Pois, todos os animais machos e fêmeas com desconformidades zootécnicas são descartadas. Deste modo, o número de animais que permanece no rebanho até completarem a idade adulta e pequeno, não justificando uma amostragem. Quanto a idade, os animais foram categorizados da seguinte forma:

- bezerras com idade entre 0-2 meses
- bezerras com idade entre 3-6 meses
- bezerras com idade entre 7-12 meses
- novilhas com idade entre 18-24 meses

Quanto ao padrão racial, os animais apresentavam o seguinte distribuição:

- 5 bezerras *Bos taurus* (Holandês)
- 5 bezerras *Bos indicus* (Gir)
- 5 bezerras $\frac{3}{8}$ *B.taurus* x $\frac{5}{8}$ *B. Indicus* (Girolando)
- 5 bezerras $\frac{1}{2}$ *B.taurus* x $\frac{1}{2}$ *B. Indicus* (meio sangue)

Para o cálculo do número de novilhas, levou-se em consideração o tamanho do rebanho. Inicialmente, existiam 70 animais, sendo selecionadas ao a cosa 35 (50% do palntel), onde foram realizadas duas amostragens, totalizando 70 amostras. Deste modo, quanto ao padrão racial as novilhas selecionadas foram estratificados da seguinte maneira:

- 9 novilhas *Bos taurus* (Holandês)
- 8 novilhas *Bos indicus* (Gir)
- 8 novilhas $\frac{3}{8}$ *B.taurus* x $\frac{5}{8}$ *B. Indicus* (Girolando)
- 9 novilhas $\frac{1}{2}$ *B.taurus* x $\frac{1}{2}$ *B. Indicus* (meio sangue)

Quanto ao grau de infestação por *R. microplus* as vacas foram classificadas da em três categorias por grau de infestação:

- Ausência de carrapatos adultos, ninfas e larvas
- Infestação leve (entre 1 e 10 teleóginas e poucas larvas e ninfas)
- Infestação média (entre 11 e 30 teleóginas e média quantidade de larvas e ninfas)
- Infestação alta (acima de 31 teleóginas e muitas larvas e ninfas)

3.6 Métodos

3.6.1 Contagem de carrapatos

Os animais foram contidos de modo individual sendo contadas todas as fêmeas ingurgitadas ou parcialmente ingurgitadas do carrapato *R. microplus* entre 4.5 e 8.0 mm de comprimento de todo o hemisfério direito do animal, segundo Wharthon; Utech (1970). A infestação por larvas e ninfas foi feita de forma subjetiva, classificando os animais em graus de infecção: leve (+), moderado (++) , moderado-alto (+++) e pesado (++++). O resultado de cada contagem foi multiplicado por dois e assim calculado a média mensal para cada animal.

3.6.2 Coleta de amostras sanguíneas

Foram coletadas amostras de sangue da veia jugular ou artéria coccígea, em tubos com anticoagulante EDTA a 15% e em tubos sem anticoagulante.

3.6.3 Amostra de *Anaplasma marginale*

A amostra de *A. marginale*, utilizada para a obtenção das proteínas principais de superfície (MSPs), foi isolada de bezerros com alta parasitêmia, oriundos de Jaboticabal, São Paulo, por Machado (1995) (dados não publicados). Essa amostra vem sendo mantida por sucessivas passagens em bezerros esplenectomizados e criopreservada em Dimetil Sulfoxido (DMSO) 10%, em nitrogênio líquido, a -196° C.

3.6.4 Sorologia

Inicialmente, foi realizado uma análise prévia com 210 amostras de soro para a detecção de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale* pelo Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (iELISA) Indireto utilizando dois diferentes antígenos. No primeiro ensaio foi utilizada metodologia descrita por Araújo et al. (1998) com antígeno total (MSP1, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5) gentilmente cedido pelo pesquisador Dr. Flávio Ribeiro de Araújo, Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. O segundo ensaio seguiu a metodologia descrita por Machado et al. (1997) utilizando antígeno total (MSP1, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5), gentilmente cedido pela professora Dra. Rosângela Zacarias Machado, Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Estadual Paulista (Unesp-Jaboticabal).

Para a análise sorológica dos animais (1378 amostras) optou-se por utilizar o antígeno total (MSP1, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5) proveniente da Unesp-Jaboticabal e a metodologia descrita por Machado et al. (1997) modificada para *Anaplasma marginale*.

Esta decisão foi apoiada na ausência de diferença estatística entre os resultados apresentados pelas duas diferentes técnicas e pelo maior disponibilidade de antígeno na Unesp. O antígeno utilizado apresentava concentração protéica de 1435µg/ml, sendo conservado em *freezer* -80°C. Os controles positivos foram produzidos a partir de animais experimentalmente infectados e positivos no exame direto (esfregaço sanguíneo), molecular (PCR) e sorologia (iELISA). Os soros negativos foram obtidos de bezerros recém-nascidos antes da ingestão do colostro, sendo sua negatividade comprovada pelas mesmas técnicas acima mencionadas os controles negativos.

3.6.5 Título de anticorpos da classe IgG para *Anaplasma marginale*

Para detecção da resposta imune humoral dos animais naturalmente infectados por *A. marginale*, amostras de soro sanguíneo foram submetidas ao ELISA-indireto segundo descrito por Machado et al. (1997) para *B. bovis* e adaptado para *A. marginale* (ANEXO A). O Elisa-teste indireto foi estabelecido por titulação em blocos, à concentração ótima do antígeno de *A. marginale* de 12 µg.ml⁻¹ diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M, pH 9,6 (ANEXO B). A diluição única do Elisa-teste foi de 1:200 para os soros de referência positiva, negativa e soros-testes, o conjugado foi utilizado na diluição de 1:25000. Nessas condições, a menor densidade óptica (DO) média dos soros negativos (n=15) foi de 0,138±0,013. A maior reatividade média verificada para os soros de referência positiva (n=15) foi de 1,13±0,123. O ponto de corte foi estabelecido de acordo com a escala de nível do ELISA (NE) anteriormente definido por Machado (1995), ou seja, os níveis de anticorpos de valor diagnóstico (NE ≥ 3) foram considerados positivos dentro do intervalo de densidade óptica de 0,310 a 0,417.

Foi utilizado 100µl de antígeno das MSPs de *A. marginale* diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9,6. Foram adicionados em cada concavidade da placa de Elisa (Maxisorp®; Nunc). As placas foram seladas e incubada por 12 horas à 4 °C. Posteriormente, as placas foram bloqueadas com solução de tampão PBS-Tween (fosfato salina, pH 7,4) (ANEXO B), adicionado de 5% de leite em pó desnatado, e incubadas por 90 minutos à 37 °C, em câmara úmida. Após três lavagens com tampão PBS-Tween foram adicionados à placa de Elisa 100µl de soro bovino diluídos em PBS-Tween (1:200) com 5% de leite em pó desnatado. As placas foram incubadas à 37 °C em câmara úmida por 90 minutos, e em seguida, lavadas com PBS-Tween por três vezes. Uma alíquota de 100µl de conjugado IgG de coelho anti-IgG de bovino, marcada com fosfatase alcalina (Sigma Chemical Co.®), diluída a 1:25000 em PBS-Tween e acrescida de 5% de leite em pó desnatado, foi adicionada em cada poço e incubada por 90 minutos. Após três lavagens com PBS-Tween, adicionou-se o substrato de enzima fosfatase alcalina p-nitrofenil fosfato (pNPP) diluído a 1mg/ml em tampão dietanolamina, pH 9,8 (ANEXO B), e as placas seladas foram incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a leitura das placas em leitor de Elisa (MRX TC Plus, Dynex Technology), filtro de 405nm.

Para efeito de classificação das áreas, foram utilizados os critérios de Mahoney; Ross (1972), que caracterizaram como estabilidade enzoótica as áreas cujos rebanhos possuem frequência de anticorpos acima de 75%, áreas de instabilidade enzoótica, aquelas com frequência inferiores a 75%, e áreas marginais aquelas cujas frequências estão muito próximas do limite.

A densidade óptica (DO) corrigida de cada amostra de soro foi calculada de acordo com a equação abaixo (MACHADO et al., 1997).

$$DOc = \frac{DO \text{ amostra} - \bar{X} \text{ DO controles negativos}}{\bar{X} \text{ DO controles positivos} - \bar{X} \text{ DO controles negativos}}$$

As amostras testes foram classificadas como positivas quando sua DO foi 2,5 vezes superior a média das DOs dos controles negativos. As amostras foram agrupadas em níveis de ELISA (NE), que variaram de 0 (nível mais baixo) a 9 (nível mais alto). A amplitude máxima dos NE zero foi determinada pela média dos valores em absorvância de soro de animais não imunes contra *A. marginale* (soro de referência negativa), acrescido de dois desvios padrão da média correspondente conforme Machado et al. (1997). A partir deste limite, os intervalos entre os outros níveis no ELISA foram acrescidos de 35% cada, Animais com média sorológica com D. Os acima de 0,350 (NE ≥ 3) foram considerados positivos.

3.7 Análise Estatística

As variáveis, sazonalidade, padrão racial, número de lactações, estado fisiológico, idade, infestação por carrapatos e densidade animal foram testadas como possíveis fatores de risco associados à altas infestações por *Rhipicephalus microplus* e à resposta imune humoral anti-*Anaplasma marginale* em bovinos leiteiros.

Todos os procedimentos operacionais foram realizados com o auxílio do software estatístico RStudio (Foundation for Statistical Computing), version 2.12.2 (2011). Os gráficos foram preparados através do software estatístico Graph Pad (Prism®) versão 4.0 (2003).

3.7.1 *Rhipicephalus microplus*

Para a análise estatística, os dados referentes as contagens de carrapatos foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Como os dados não apresentaram distribuição normal mesmo após a transformação logaritmica $\text{Log}_{10}(x + 1)$, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wills a 5% de significância para a comparação entre as médias das contagens de carrapatos em função em cada estrato avaliado. Posteriormente os dados foram submetidos a regressão linear para medir a força da associação entre a variável dependente e a variável independente e ao modelo de distribuição de Poisson para verificar a significância de cada fator de risco em um modelo multivariado. Por fim, foi realizado o teste de Spearman para verificar a interação entre as variáveis.

3.7.2 *Anaplasma marginale*

Inicialmente foi realizada análise exploratória dos dados, sendo calculada a frequência de soropositivos para cada fator de risco estudado. Para verificar a existência de interação entre as variáveis os dados foram submetidos ao teste de Spearman. Para avaliar a associação entre a variável frequência de animais soropositivos para *A. marginale* com os potenciais fatores de risco, os dados foram submetidos ao teste de qui-quadrado (χ^2) e, em seguida, para todos os fatores de risco foi realizada uma análise dicotomizada através da “odds ratio” (OD).

Por fim, todas as variáveis foram oferecidas à regressão logística multivariada para confirmar a existência de associação entre as variáveis. O modelo foi construído baseado no teste da “odds ratios”. Todas as variáveis foram introduzidas no modelo, sendo selecionados pela seleção backward. O nível de significância para manter um fator no modelo final foi fixado em 5% com base no valor do χ^2 .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *Rhipicephalus microplus* Durante o Periparto

O efeito do periparto sobre a infestação pelo carrapato *R. microplus* foi observado em todos os fatores avaliados por análise bivariada, porém algumas classes não diferiram significativamente no modelo de distribuição de Poisson (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação dos fatores de risco para a infestação por *Rhipicephalus microplus* em vacas durante o periparto por distribuição de Poisson.

Fatores de risco	N	OR	p-valor	IC 95%
Periparto				
(1) pré parto*	400	-	-	-
(2) parto	80	3.12	0.000	[0.181 – 0.565]
(3) pós parto	400	2.02	0.000	[0.620 – 0.678]
Estação do ano				
(1) seca*	440	-	-	-
(2) chuva	440	0.63	0.020	[0.654 - 1.611]
Raça				
(1) <i>B. indicus</i> *	165	-	-	-
(2) F1	165	1.64	0.050	[0.746 – 0.816]
(3) Girolando	385	1.39	0.050	[0.629 – 0.669]
(4) <i>B. taurus</i>	165	2.10	0.000	[0.442 – 0.510]
Nº de Lactações				
(1) 1ª lactação*	220	-	-	-
(2) 2ª lactação	220	0.97	0.049	[0.631 – 0.919]
(3) 3ª lactação	330	0.91	0.000	[0.871 – 0.958]
(4) >4ª lactação	110	0.97	0.035	[0.429 – 0.716]
Prod. Leite kg/ano				
(1) < 1500*	220	-	-	-
(2) > 1500 < 3000	495	0.91	0.125	[0.988 – 1.096]
(3) > 3000	165	1.04	0.003	[0.852 – 0.969]
Densidade animal				
(1) baixa*	200	-	-	-
(2) média	560	1.13	0.668	[0.640 – 1.999]
(1) alta	320	4.32	0.000	[0.029 – 0.071]

* Valor referência, N= número de amostras avaliadas, OR= Odds ratio, IC 95%= interval de confiança

A contagem de carrapato apresentou alta correlação ($r^2 = 0.75$) com o período periparto, porém, essa correlação foi maior ainda ($r^2 = 0.99$) quando levado em consideração a infestação média durante os períodos pré-parto, parto e pós parto. A infestação por *R. microplus* foi significativamente maior no parto ($p < 0.05$; OR= 3.12). O pós parto também apresentou aumento significativo ($p < 0.05$; OR= 2.02) do número de carrapatos em relação ao pré parto.

No periparto, a contagem média de *R. microplus* foi de 20 carrapatos por animal durante o pré-parto, 37 no parto e 45 no pós parto. Assim, foi observado aumento significativo ($p < 0.05$) na infestação por *R. microplus* a partir da quinta semana anterior ao parto (16 carrapatos/animal) até a primeira semana do pós parto, onde atingi o mais alto parasitismo (58 carrapatos/animal). Posteriormente, observou-se redução significativa da

infestação até a quinta semana do pós parto (42 carrapatos/animal) onde a infestação não diferiu estatisticamente ($p>0.05$) do parto (Figura 2).

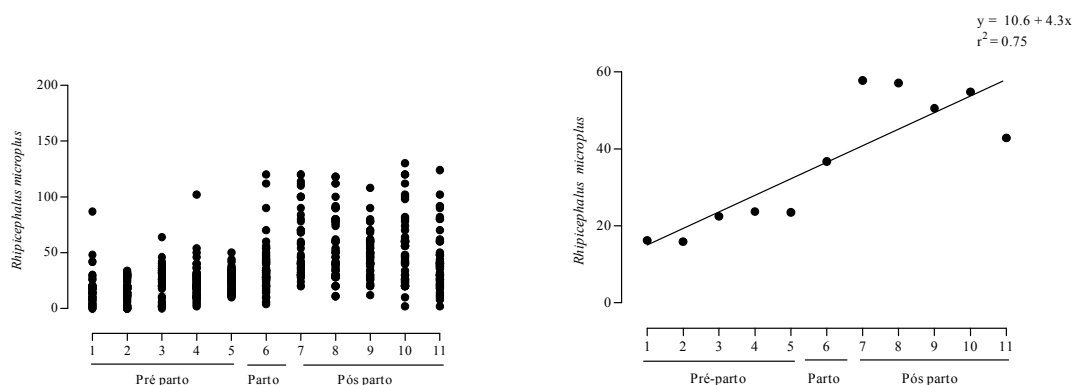


Figura 2. Avaliação da associação da contagem de *Rhipicephalus microplus* adultos em vacas em função do parto, Pesagro-Rio, 2008-2010.

A avaliação qualitativa da infestação por estágios imaturos (larvas e ninfas) de *R. microplus* demonstrou uma correlação positiva ($r^2= 92$) com o periparto (Figura 3). Há cinco semanas do parto, todos os animais estavam parasitados por larvas e ninfas de *R. microplus*, porém, apenas 1% dos animais apresentavam infestação alta e 84% infestação baixa. Na 5ª semana após o parto 47% dos animais apresentaram infestação alta e apenas 12% infestação leve.

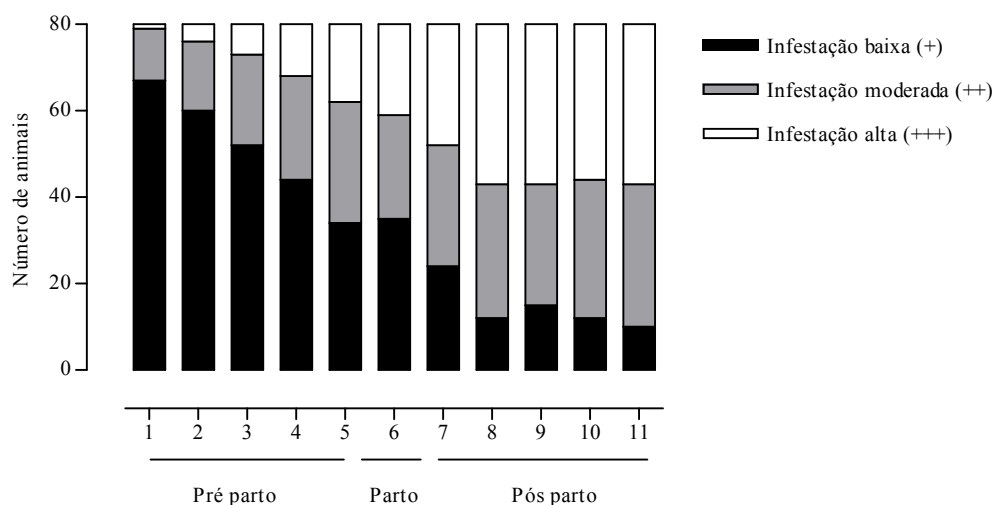


Figura 3. Avaliação da associação da contagem de larvas e ninfas de *Rhipicephalus microplus* em vacas em função do parto, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Há evidências substanciais no gado leiteiro que o mecanismo de defesa inata e adquirida são prejudicados durante o período do periparto, quando a ocorrência da doença é máxima (KEHRLI et al, 1989a; 1989b; MALLARD et al, 1998a). Esta capacidade de resposta reduzido inclui alterações na imunidade sistêmica, e salienta alterações físicas e metabólicas da gravidez, parto e lactação, que contribuem substancialmente para diminuição da resistência e aumento da incidência de doenças infecciosas durante o periparto em vacas.

Os resultados deste estudo corroboram com aqueles observados por Fraga et al. (2003) onde a contagem de carrapatos foi superior em vacas no final da gestação ou recém paridas em relação aos demais animais do rebanho. Os autores creditaram a maior infestação durante este período a suscetibilidade imunológica das vacas durante o periparto. Utech et al. (1978a) observaram que as vacas gestantes foram menos resistentes que as não gestantes a infestação por carrapatos. Assim, afirmam, que o estresse da gestação e as mudanças hormonais podem causar queda da resistência ao carrapato justificando o maior parasitismo neste período. Também, Lima et al. (2000), observaram aumento da população de carrapatos adultos ao longo do periparto, conforme demonstrada pela alta correlação entre a distribuição desse ixodídeo e as fases de pré-parto, parto e pós-parto. Nossos resultados são concordantes com este estudo, pois foi observado correlação positiva de 0.85 entre as semanas do parto.

A partir da última semana de gestação foi observado um aumento significativo ($p < 0.05$) da contagem de *R. microplus*, sendo observado infestação média sempre superior a 30 carrapatos por animal. No Brasil estimou-se uma redução de 23% na produção de leite/dia, quando vacas mestiças (Holandês x Zebu) foram infestadas com uma média de 105 carrapatos (FURLONG et al., 1996). Além disso, Teodoro et al. (1998) relataram uma redução de 529 kg (26%) de leite/lactação em vacas holandesas.

4.1.1 Sazonalidade

O efeito do periparto sobre a infestação pelo carrapato *R. microplus* foi observado independente da estação do ano (Figura 4).

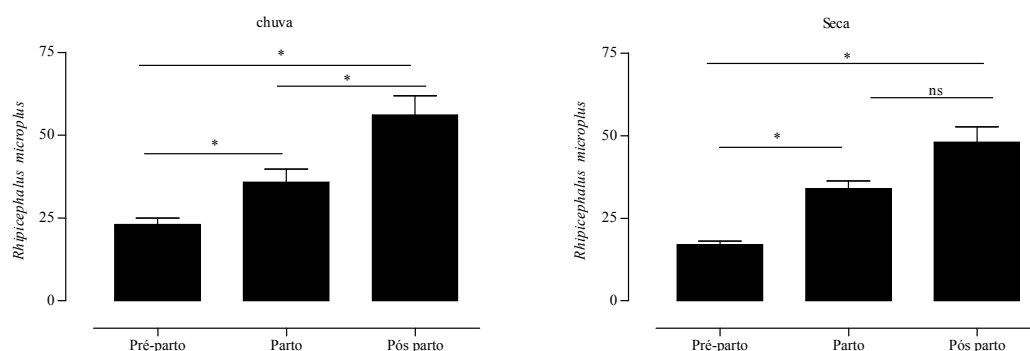


Figura 4. Variação média da contagem de *Rhipicephalus microplus* em vacas paridas durante a estação seca (outono e inverno) e chuvosa (primavera e verão), Pesagro-Rio, 2008-2010.

A contagem média de carrapatos durante a chuva foi de 38 carrapatos/animal, ao passo que na seca foi de 33 carrapatos/animal, não sendo observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$; OR= 0.63). A infestação por *R. microplus* no pré-parto, parto e pós-parto dos animais que pariram na estação chuvosa foi numericamente superior aos animais que pariram na seca, porém, não apresentou diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Doube; Wharton (1980) afirmaram ser possível a existência de um ciclo sazonal na expressão da resistência ao carrapato em bovinos, decorrente da flutuação da capacidade imunitária do animal contra o parasita, a qual se manifesta com queda da resistência no outono e no início do inverno, independentemente da raça e do estado nutricional do animal. Vários autores demonstraram a influência dos fatores sazonais no ciclo de vida dos carrapatos e, conseqüentemente, a diferença de infestações nos animais, que variam de acordo com o clima da região em que vivem e com a época do ano

(OLIVEIRA et al, 1989). A fase de vida livre de *R. microplus* é bastante influenciada, principalmente pela temperatura e umidade (GONZALES, 1975). No presente estudo, apesar da distribuição da população de *R. microplus* não ter apresentado grande semelhança entre os dois anos estudados, os valores médios de teleóginas durante o periparto foram similares.

A literatura apresenta resultados bastante discordantes quanto à época do ano de maior infestação por ectoparasitas. Brum et al. (1987) e Andrade et al. (1998) foram enfáticos em apontar o outono como a estação que apresenta as maiores médias de infestação por carrapatos. Por outro lado, Utech et al. (1978a) observaram que a média de carrapatos no inverno foi significativamente superior em relação à média obtida no verão.

Ao avaliar o grau de infestação por *R. microplus* em função da estação do ano, o presente trabalho apresentou resultados semelhantes aos observados por Guaragna et al. (1988) no Brasil. Os autores não observaram efeito significativo ($p > 0.05$) das estações do ano sobre o número de carrapatos. Estes autores verificaram que a infestação média de 47,74 e 51,15 carrapatos/animal, nos períodos seco e chuvoso, não diferiram significativamente ($p > 0.05$).

Certamente, diferenças climáticas existentes entre os locais e os períodos de em que foram realizados os vários estudos citados são responsáveis pelas diferentes infestações dos ectoparasitas nas diferentes épocas do ano. Nos trópicos, embora durante o período chuvoso os carrapatos encontrem melhores condições ambientais para sobreviver no ambiente, é as práticas de manejo para combater este parasito também são intensificadas. Na propriedade estudada, não existia um programa de controle de carrapatos previamente definido. Deste modo, os animais receberam banho com acaricidas e aplicação de ectoparasiticidas de acordo as observações de infestações dos ectoparasitos sobre o animal.

4.1.2 Padrão racial

A contagem média de *R. microplus* durante o periparto foi de 55 carrapatos em animais *Bos taurus*, 39 nos animais *B. taurus* x *B. indicus*, 29 nos animais Girolandos e 18 nos animais *Bos indicus* (Figura 5). O padrão racial apresentou alta associação ($r^2 = 0,99$) com a densidade de *R. microplus* nos animais, sendo que em todas as fases do periparto, os animais com maior proporção de sangue taurino foram mais vulneráveis e apresentaram maior população média de *R. microplus* ($p < 0,05$; OR = 2.10).

Animais *B. indicus* e seus cruzamentos tem sido utilizados no controle de *R. microplus* na América Latina tem sido empírica passado devido às vantagens de gestão para trópicos e subtropicais (HENRIOUD, 2011). A inclusão de raças resistentes a carrapatos por programas de melhoramento pode aumentar a resistência média de gado dentro de um rebanho. Essa prática tem mostrado resultados em infestações leves e populações menores de carrapatos, com uma menor necessidade de tratamento (HENRIOUD, 2011). Os resultados do presente estudo corroboram com aqueles observados por Lima et al. (2000), os quais observaram média mensal de 22,4 carrapatos em animais $\frac{3}{4}$ Gir $\frac{1}{4}$ Holandês, enquanto para animais com maior grau de sangue taurino a média mensal foi de 65,5 carrapatos.

A variação média da contagem de carrapatos observada neste estudo demonstrou uma clara diferença entre o nível de resistência dos animais *B. taurus* e *B. indicus*. Além disso, pode-se constatar que os animais mestiços apresentaram resistência intermediária entre animais *B. taurus* e *B. indicus*, porém quanto maior o grau de sangue zebuino maior foi a resistência. Estes resultados reforçam os achados de Tatchell; Moorhouse (1968), os quais observaram em animais *B. taurus* maior suscetibilidade a carrapatos quando

comparado a animais *B. indicus*. Estes autores atribuíram a maior suscetibilidade dos taurinos à intensa reação no local de fixação do carrapato, criando assim um ambiente favorável a manutenção do parasito.

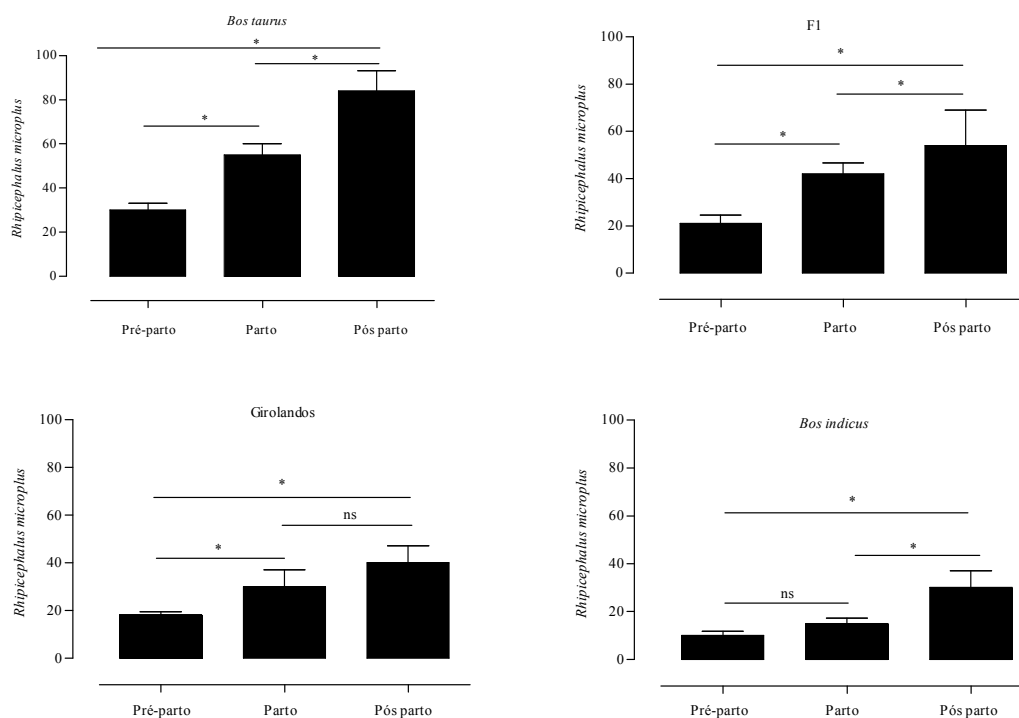


Figura 5. Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas durante o periparto em função do grupo genético, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Porém, apesar de muitos estudos terem sido realizados demonstrando a diferença entre zebuínos e taurinos, poucos são os estudos que demonstram o grau de resistência de animais mestiços. Observamos neste estudo que animais meio sangue *B. taurus* e *B. indicus* permanecem vulneráveis ao passo que animais 5/8 zebuínos tornaram-se resistentes. Estes resultados demonstram que para obter animais mais resistentes ao carrapato é necessário não apenas criar animais mestiços, mas animais que tenham grau de sangue zebuino predominante.

Segundo Sutherst et al. (1983) a utilização de raças resistentes é o melhor método de controle não químico de carrapato de bovinos. Deste modo, o presente estudo observou que a seleção para a reprodução de animais mestiços de boa produtividade seria uma saída viável para os produtores lacteos nos trópicos, onde a infestação de carrapatos constitui um fator limitante para o desenvolvimento da bovinocultura leiteira.

4.1.3 Número de lactações

A contagem média de *R. microplus* durante o periparto foi significativamente maior ($p < 0.05$; OR = 0.97) nos animais de 1ª lactação (60 carrapatos/animal), seguidos por animais de 2ª lactação (44 carrapatos/animal), 3ª lactação (19 carrapatos/animal) e animais de mais de 4ª ou mais lactações (16 carrapatos/animal). Porém, não foi observada diferença significativa ($p > 0.05$) entre os animais de 3 ou mais lactações.

Nas três fases do periparto a contagem de *R. microplus* foi significativamente maior ($p < 0.05$) nos animais primíparas do que nos pluríparas (Figura 6).

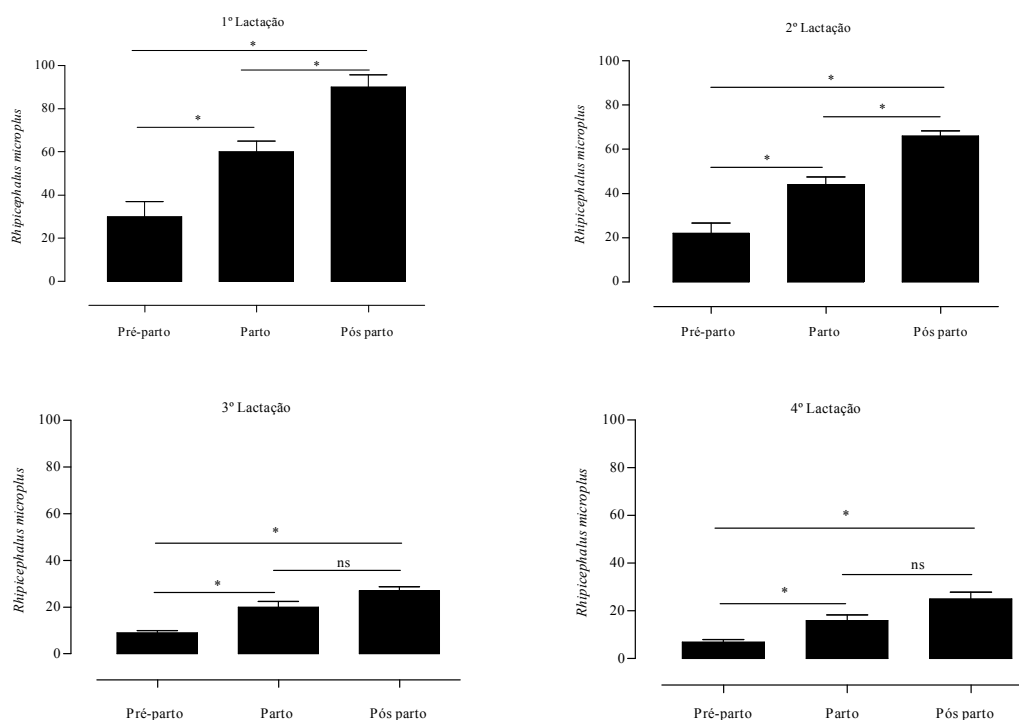


Figura 6. Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas primíparas e pluríparas, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Neste estudo não foi observado efeito quadrático da idade sobre a infestação por carrapatos, como verificaram Teodoro et al. (1994). Andrade et al. (1998), verificaram que os animais mais velhos são os mais susceptíveis ao carrapato. Fraga et al. (2005), também observaram efeito quadrático da idade do animal sobre a infestação por carrapatos; a infestação foi máxima aos 5,18 anos de idade. Neste estudo, observou-se que os animais mais velhos foram mais resistentes, provavelmente em função do maior contato com esse parasito e com isso o desenvolvimento de uma resposta adquirida.

Os resultados deste estudo corrobora Silva et al. (2010) que observaram maiores contagens de carrapatos em vacas primíparas em relação a vacas pluríparas. Fraga et al. (2005) também observou efeito significativo na contagem de carrapatos em função da idade do animal. Em um estudo, embora as diferenças nas concentrações séricas de globulina nos rebanhos leiteiros individuais e entre os grupos etários foram pronunciadas, não foram associados com a época ou fase da gestação (LIBERG, 1977).

4.1.4 Produção leiteira

A produtividade leiteira demonstrou correlação negativa ($r^2 = 0,89$) com a resistência dos animais à infestação por *R. microplus*. Os animais com alta produção de leite foram significativamente ($p < 0,05$; 1.04) mais vulneráveis à infestação do que animais de baixa e moderada produção. A contagem média de *R. microplus* durante o periparto nos animais de alta produção foi de 58 carrapatos/animal, média produção 28 carrapatos/animal e baixa produção 19 carrapatos/animal (Figura 7).

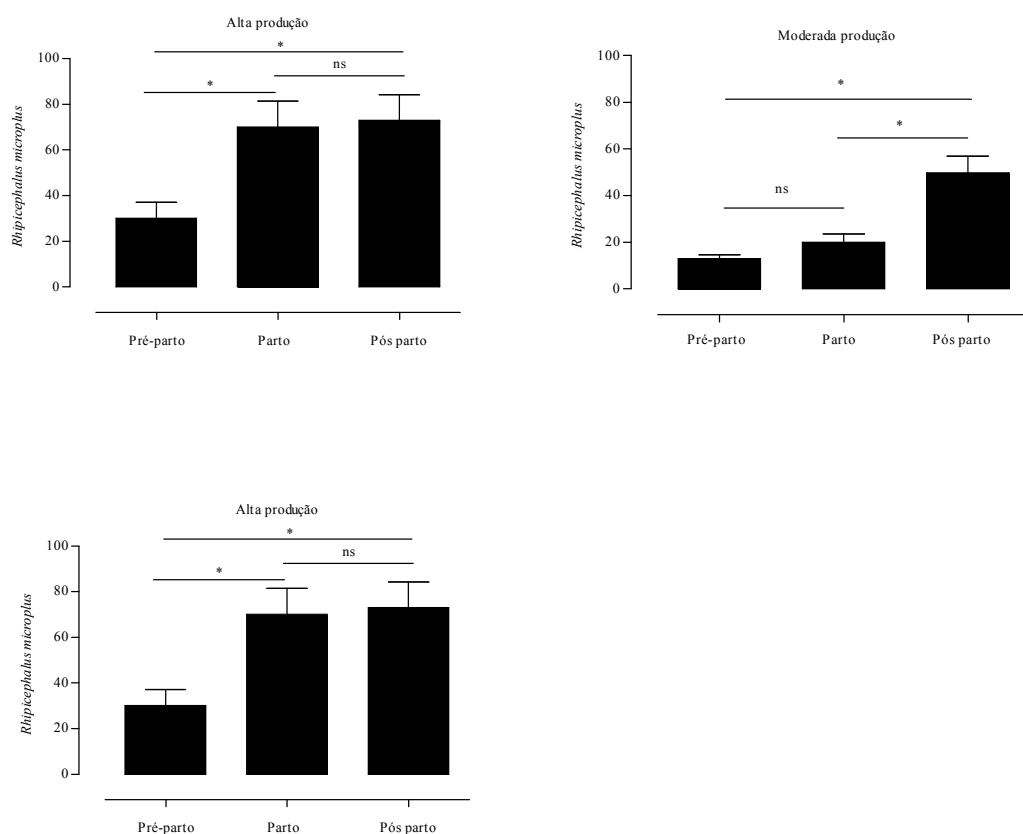


Figura 7. Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas de baixa, moderada e alta produção leiteira, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Kitchenham et al. (1975), Bertrand et al. (1985) e Emanuelson et al. (1988) observaram uma relação inversa entre a produção de leite e a incidência de doenças. Vacas selecionadas para alta produção de leite tinham número de neutrófilos circulantes e células mononucleares significativamente maior do que vacas com potencial produtivo médio (DETILLEUX et al., 1995). Estes resultados podem ser considerados animadores, visto que a seleção para alta produção de leite não produz respostas desfavoráveis relacionados a capacidade funcional das características imunológica. Porém, embora apresentem um sistema imune ativo, animais de alta produção são acometidos por um número maior de doenças, sobretudo durante o periparto (DETILLEUX et al., 1995).

Kehrli et al. (1991b) não observaram diferença significativa ($p > 0.05$) entre a prevalência de doenças em vacas lactantes de alta e média produção leiteira. Pode ser possível que as diferenças que existem entre as linhagens são maiores apenas durante o período periparto, quando a incidência de estresse e doenças são maiores (DETILLEUX et al., 1995). Por outro lado, embora os animais mais produtivos sejam mais acometidos por doenças, eles ainda são mais rentáveis ao produtor de leite (BERTRAND et al., 1985).

4.2 *Rhipicephalus microplus* em Vacas em Diferente Estados Fisiológicos

O efeito do estado fisiológico sobre a infestação pelo carrapato *R. microplus* foi observado na estação do ano, raça, número de lactações, produção de leite e densidade animal, através da distribuição de Poisson estão representado a baixo (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação dos fatores de risco para a infestação por *Rhipicephalus microplus* em vacas de diferentes estados fisiológicos por distribuição de Poisson.

Fatores de risco	N	OR	p-valor	IC 95%
Estado fisiológico				
(1) seca*	50	-	-	-
(2) gestante	50	0.32	0.000	[0.42 - 0.86]
(3) periparto	50	0.12	0.000	[0.34 - 0.68]
(3) lactante	50	0.22	0.000	[0.12 - 0.38]
Raça				
(1) <i>B. indicus</i> *	35	-	-	-
(2) girolando	65	1.64	0.060	[0.88 - 3.23]
(3) F1	45	1.39	0.010	[1.63 - 5.37]
(4) <i>B. taurus</i>	55	2.10	0.000	[2.79 - 9.71]
Nº de lactação				
(1) 1ª lactação*	40	-	-	-
(2) 2ª lactação	50	0.97	0.239	[0.37 - 1.09]
(3) 3ª lactação	60	0.91	0.000	[0.07 - 0.24]
(4) >4ª lactação	50	0.97	0.005	[0.09 - 0.26]
Prod. de leite kg/ano				
(1) < 1500*	70	-	-	-
(2) > 1500 < 3000	90	0.86	0.125	[0.40 - 1.06]
(3) > 3000	40	2.54	0.003	[0.20 - 0.69]
Densidade animal				
(1) baixa*	50	-	-	-
(2) média	50	1.24	0.584	[0.69 - 1.07]
(1) alta	50	6.32	0.000	[1.46 - 1.89]

* Valor referência, N= número de amostras avaliadas, OR= Odds ratio, IC 95%= interval de confiança

No presente estudo, observou-se relação entre gestação, parto e lactação com a infestação por carrapatos (Figura 8). Observou-se um aumento significativo ($p < 0.05$) da infestação por *R. microplus* do grupo de vacas secas para o grupo de vacas gestante e periparto, havendo uma redução não significativa ($p > 0.05$) do periparto para a lactação.

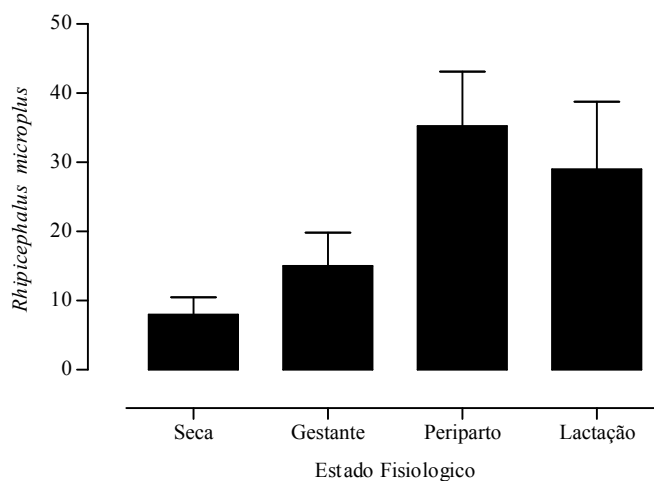


Figura 8. Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas vazias, gestantes, periparto e lactantes, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Jonsson et al. (2000) observaram que do início da gestação até a parição não ocorreu nenhuma alteração na resistência do animal contra carrapatos. Porém, segundo Utech et al. (1978a), animais gestantes são mais susceptíveis a infestação por carrapato sobretudo, no terço final da gestação a suscetibilidade é ainda maior. Esses autores afirmam que o estresse da gestação e as mudanças hormonais podem causar queda da resistência ao carrapato.

A maior suscetibilidade das vacas durante o periparto pode ser explicada pela transferência maciça de anticorpos destas para o colostro nas quatro últimas semanas de gestação (SASAKI et al., 1976). Brandom et al. (1971) notaram que o nível de imunoglobulinas sericas alcança máxima concentração na glândula mamária e uma máxima diminuição na circulação sanguínea materna 2 a 3 semanas antes do parto. Essa característica pode interferir na imunidade passiva, pois vacas que sofrem pequeno período seco podem apresentar menores quantidades de imunoglobulinas sericas em seu colostro (ROY, 1990).

4.2.1 Padrão racial

A contagem de *R. microplus* apresentou correlação positiva ($r^2=0.96$) com o padrão racial. Em todos os estados fisiológicos, as maiores contagens de *R. microplus* foram observadas nos animais *B. taurus* (OR= 2.10) e as menores nos animais *B. indicus* (Figura 9).

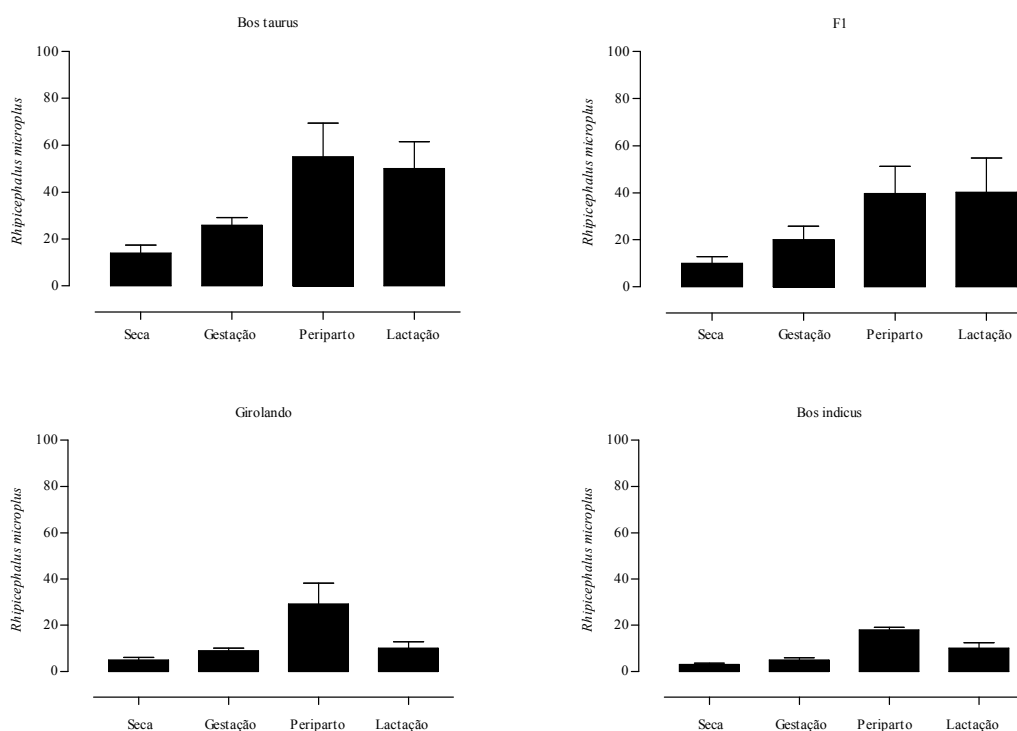


Figura 9. Variação média e desvios padrões da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas *B. taurus*, *B. indicus* e mestiças em diferentes estados fisiológicos, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Sutherst et al. (1983) observaram que a expressão da resistência dos bovinos ao carrapato é influenciada por muitos fatores ambientais, assim como fatores intrínsecos ao animal, porém, raça é o fator que mais influencia na sobrevivência do carrapato. A diferença entre a resistência de animais *B. taurus* e *B. indicus* foi significativa ($p<0.05$),

de tal modo que foi possível observar influência deste fator de forma mais determinante na contagem de carrapatos do que os demais fatores avaliados. Esses resultados demonstram que, embora os animais sejam mais susceptíveis em determinadas fases fisiológicas, em momento algum um animal *B. indicus* foi mais suscetível do que um animal *B. taurus*.

4.2.2 Número de lactações

Observou-se que os animais de primeira lactação apresentaram contagem de carrapatos significativamente superior ($p < 0,05$) às vacas de segunda ou mais lactações. O número de lactações influenciou negativamente ($r^2 = 0,93$) no grau de infestação de carrapatos (Figura 10).

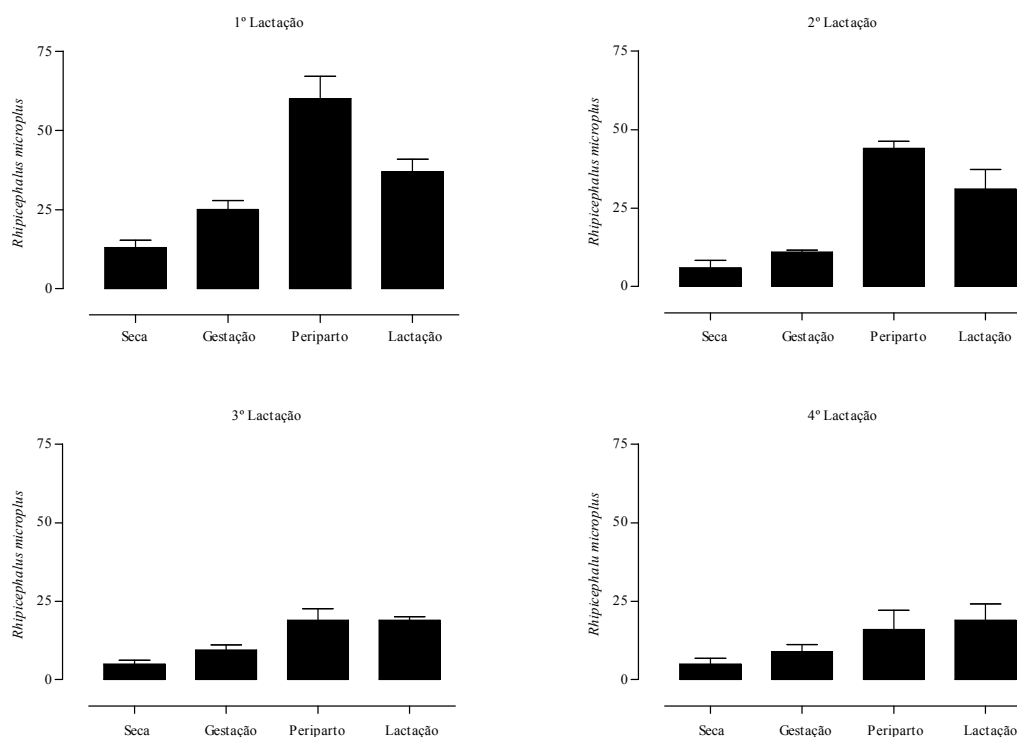


Figura 10. Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas de 1º lactação, 2º lactação e 3º ou mais lactações, diferentes estados fisiológicos, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Os resultados da literatura científica com relação à experiência reprodutiva animais e a infestação por carrapatos são escassos e discordantes. Teodoro et al. (1994), ao trabalharem com bovinos de leite, observaram efeito quadrático da idade sobre a infestação por carrapatos, indicando que as vacas de 1ª cria são mais susceptíveis. No entanto, Andrade et al. (1998), em vacas Gir, verificaram que os animais mais velhos são os mais susceptíveis. Jonsson et al (2000) observaram níveis de resitência de 75.1, 72.3 e 69.7% em animais de 1ª lactação, entre 2ª e 5ª e acima de cinco, respectivamente.

A idade das vacas demonstrou relação direta com a infestação por carrapatos. Porém, a partir de três ou quatro anos, quando os animais encontravam-se próximos ao segundo parto, observou-se redução seguida por uma estabilização da infestação por carrapatos. Utech et al. (1978a) demonstraram que além da raça, a resistência é influenciada pela idade, sendo alta entre os bezerros e animais adultos e baixa em vacas durante a lactação.

4.2.3 Produção leiteira

A produtividade leiteira demonstrou influência negativa ($r^2=0.89$) na contagem de *R. microplus* (Figura 11). Vacas de alta produtivo apresentaram infestação por carrapatos significativamente superior ($p<0,05$) aos animais de média e baixa produção durante os quatro estados fisiológicos analisados. O potencial produtivo dos animais demonstraram maior influência sobre a infestação por carrapatos do que o estado fisiológico. Pois, as vacas de alta produção, mesmo quando secas a contagem média de *R. microplus* não diferiu significativamente ($p>0.05$) da infestação observada nas vacas lactantes de baixa produção.

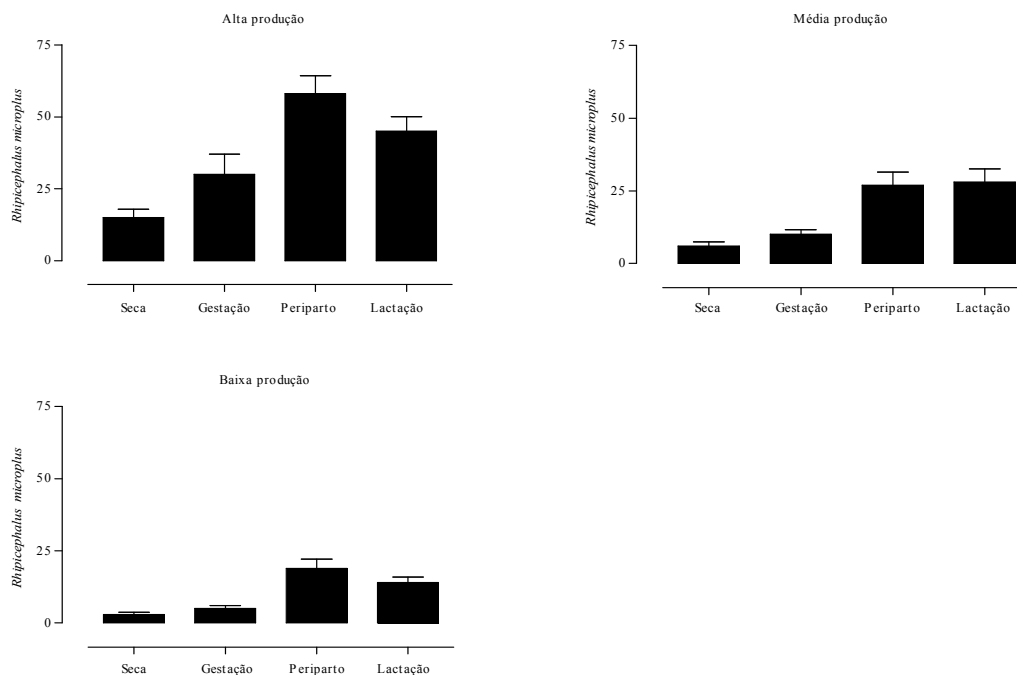


Figura 11. Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas de diferente potencial produtivo e estado fisiológico, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Johnston; Haydock (1969) estudando a incidência de carrapatos em vacas leiteiras, observaram apenas uma fraca associação entre número de *R. microplus* e o potencial produtivo. Porém, Dixon et al. (1961) observaram que em bovinos de leite, provavelmente em função da especialização e do relaxamento imunológico durante o periparto, ocorre uma queda na imunidade sistêmica dos animais.

No México, estima-se que a infestação por carrapatos ocasionem redução de, aproximadamente, 48% da produção de leite e perda de 40 a 50 Kg durante a vida produtiva de novilhas (BELTRAN, 1977). No Brasil estimou uma redução de 23% na produção de leite/dia, quando vacas mestiças (Holandês x Zebu) foram infestadas com uma média de 105 carrapatos (FURLONG et al., 1996). Além disso, Teodoro et al. (1998) relataram uma redução de 529 kg (26%) de leite/lactação em vacas Holandesas. Na Austrália, vacas de alta produção submetidas a alta carga de carrapatos apresentaram redução de 2,86 kg de leite/dia e 10,6 kg de peso vivo (JONSSON et al., 1998).

4.2.4 Densidade animal

Quando mantidos sob baixa densidade, observou-se que os animais apresentaram contagem de *R. microplus* significativamente inferior ($p<0.05$; OR= 6.32) aos animais

mantidos em sob taxa de lotação alta. A densidade animal demonstrou correlação positiva com a infestação por *R. microplus* (Figura 12).

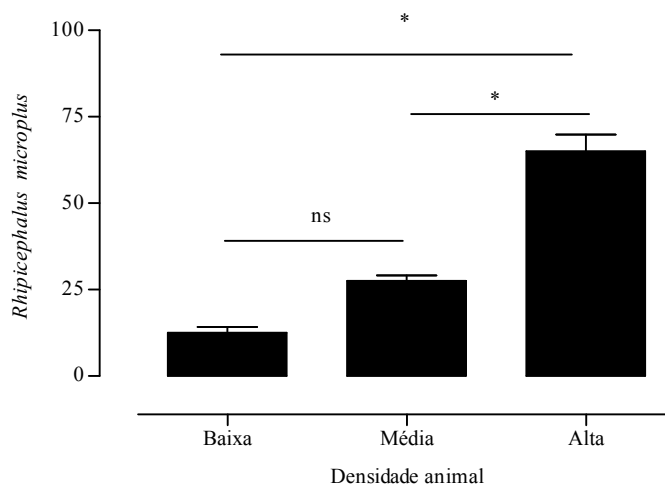


Figura 12. Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em vacas mantidas sob baixa, média e alta densidade animal a pasto, Pesagro-Rio, 2008-2010.

4.3 *Rhipicephalus microplus* em Bezerros

Observou-se variação da contagem de *R. microplus* em função dos fatores de risco avaliados. A idade, genética e densidade animal demonstraram estarem associadas ao grau de infestação por carrapatos em bezerros até um ano de idade.

4.3.1 Idade

A idade dos animais demonstrou ser um importante fator de risco sobre o grau de infestação por carrapatos (Figura 13). As bezeras mais jovens, do nascimento aos dois meses, foram pouco parasitadas (10 carrapatos/animal), sendo que a infestação aumentou significativamente ($p < 0.05$) nos animais de três a seis meses (31 carrapatos/animal). Os animais com idade entre sete e doze meses apresentaram infestação moderada (15 carrapatos/animal) e os animais com idade superior a doze meses apresentaram infestação baixa (4 carrapatos/animal).

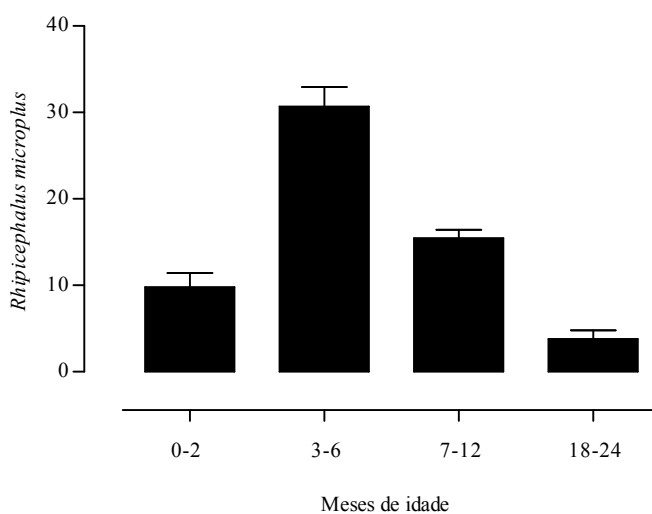


Figura 13. Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em bezerros em função da idade, Pesagro-Rio, 2008-2010.

A influência da idade sobre a resistência ao carrapato tem sido observada em varios estudos. Verissimo et al. (1997) observou que bezerros lactentes ou muito jovens são resistentes a carrapatos em função de alguns fatores presentes no colostro, leite e sangue. Nos meses subseqüentes torna-se menos resistencia, passando por uma fase de maior suscetibilidade na puberdade e a resistência se estabiliza quando o sistema imune do animal está completamente amadurecido.

Embora a imunidade inata decorrente de diferenças genéticas entre raças zebuínas e taurinas seja a base do conhecimento sobre a resistência dos animais, a imunidade dos bovinos é considerada predominantemente adquirido, pois o nível de resistência em *B. indicus* se torna aparente somente após um período de suscetibilidade à uma infestação primário (HEWETSON, 1971). Neste estudo, embora os bezerros tenham permanecido por grande parte do tempo parasitados por carrapato, a carga parasitária foi relativamente baixa. O fato dos animais receberem volumoso e ração balanceada no período seco do ano provavelmente levou a melhoria da condição de escore corporal e conseqüente manutenção da atividade do sistema imune contra parasitos.

4.3.2 Padrão racial

O padrão racial demonstrou influenciar significativamente ($p < 0.05$) na contagem de *R. microplus* em bezerras. Durante todo o estudo as bezerras *B. taurus* (38 carrapatos/animal) foram mais infestados do que os *B. indicus* (6 carrapatos/animal) e seus mestiços, F1 (17 carrapatos/animal) e Girolandos (10 carrapatos/animal). Não foi observada diferença significativa ($p > 0.05$) entre os mestiços (Figura 14).

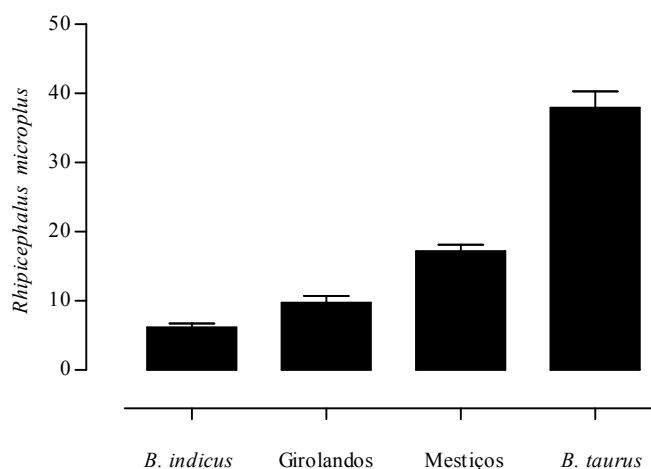


Figura 14. Variação média da contagem de carrapatos *Rhipicephalus microplus* em bezerras em função do padrão genético, Pesagro-Rio, 2008-2010.

A imunidade adquirida naturalmente tem sido proposta como um viável método de controle por causa do potencial de redução do uso de acaricida quando associado a seleção de animais, práticas de manejo como a rotação de pastagens com controle químico (FRISCH, 1999). As raças de bovinos *B. indicus* são mais resistentes ao *R. microplus* do que *Bos taurus*, embora considera-se que a resistência possa variar entre raças e indivíduos (SEIFERT, 1971; WHARTON et al., 1970). A resistência a infestação por carrapatos apresenta alta herdabilidade, sendo a taxa estimada entre 39% e 49% para *B. taurus* (WHARTON et al., 1970) e 82% em *B. indicus* (SEIFERT, 1971). Assim como nos estudos iniciais, esta pesquisa demonstrou que o status de resistência de raças *B.*

taurus e *B. indicus* pode ser uma importante ferramenta através da seleção de animais visando o incremento da resistência contra carrapatos.

4.4 Avaliação da Resposta Imune Humoral anti-*Anaplasma marginale*

Foi observado absorvância de $1,13 \pm 0,123$ para os controles positivos ($n=15$) e $0,138 \pm 0,013$ para os controles negativos ($n=15$). Baseado na média da absorvância dos controles negativos foi estabelecido o primeiro NE, sendo os níveis determinado pelo incrementando de 35% sobre o nível anterior (Tabela 3). Os títulos de anticorpos contra *A. marginale* dos soros de vacas no periparto ($n = 880$), vacas secas, gestantes e lactantes ($n=600$) e bezerros ($n=284$), mantidos em área infestada por *Rhipicephalus microplus*, testados por iELISA estão distribuídos em NE na figura abaixo (Figura 15).

Tabela 3. Classificação dos soros testes A/P (amostra/Positivo) em NE (Níveis de Elisa) variando de 0-9.

NE	A/P
0	0.000 - 0.150
1	0.151 – 0.203
2	0.204 – 0.275
3	0.276 - 0.372
4	0.373 – 0.503
5	0.504 – 0.680
6	0.681 – 0.919
7	0.920 – 1.241
8	1.242 – 1.676
9	> 1.676

NE = Níveis de Elisa; S/P = Absorvância das amostras em relação ao referencial positivo

Durante o periparto 33,2% das amostras analisadas foram classificadas no primeiro nível de ELISA (NE=0) e apenas duas amostras foram observadas no último nível (NE=9). Entre as vacas lactantes e secas, 10,6% das amostras encontraram-se no nível zero e apenas duas no nível 9. Entre os bezerros, 3,5% das amostras encontraram-se no NE zero, ao passo que nenhum animal atingiu os três últimos níveis (7, 8 e 9).

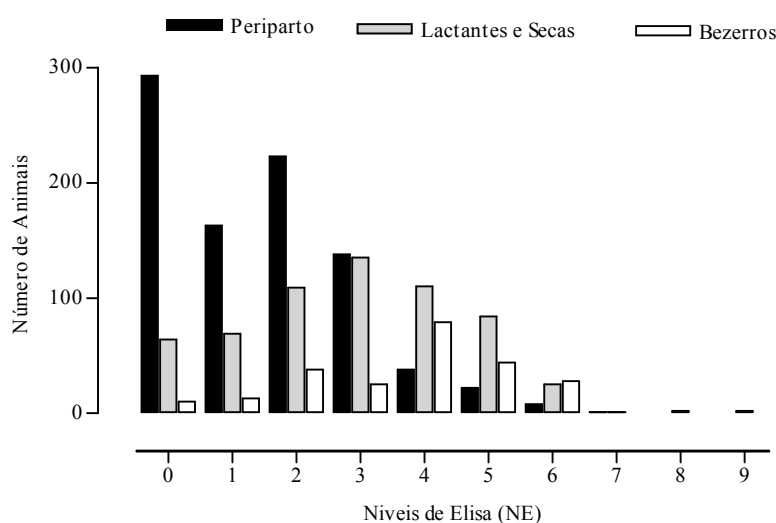


Figura 15. Número de soros de vacas no periparto ($n = 880$), lactantes e secas ($n=600$) e bezerros ($n=284$) mantidas em área infestada por *Rhipicephalus microplus*, testados por iELISA contra *Anaplasma marginale* e classificadas em Níveis de Elisa (NE).

Vacas durante o periparto apresentaram níveis baixos de anticorpos, sendo o número de animais com NE zero significativamente maior ($p < 0.05$) do que no grupo de bezerros e vacas secas, gestantes e lactantes. Machado et al. (1997) estudando *Babesia bovis*, também observaram diferença significativa entre o número de amostras de bezerros e vacas no NE zero. Os autores observaram que poucos animais encontraram-se neste nível e grande número de amostras foram classificadas nos níveis 7, 8 e 9. A baixa absorvância observada nos soros analisados neste estudo é consequência da baixa exposição do agente na região.

4.5 Títulos de Anticorpos da Classe IgG anti-*A. marginale* Durante o Periparto

O número de animais soropositivos variou significativamente ($p < 0.05$) em função do parto, estação do ano, genética, número de lactação, produção leiteira, densidade de vetor e densidade animal (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação dos fatores de risco para frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* por χ^2 em vacas durante o periparto, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Fatores de risco	N	P (%)	χ^2	OR	p-valor	IC 95%
Periparto						
(1) pré-parto*	400	17%	-	-	-	-
(2) parto	80	8%	5.0	2.61	0.025	[1.08 – 7.63]
(3) pós-parto	400	26%	8.5	0.60	0.003	[0.42 – 0.86]
Estação						
(1) Chuva*	440	27%	-	-	-	-
(2) Seca	440	14%	25.1	2.3	0.000	[0.29 – 0.60]
Raça						
(1) <i>B. indicus</i> *	165	41%	-	-	-	-
(2) <i>B. taurus</i>	165	10%	43.2	6.52	0.000	[0.08 – 0.28]
(3) FI	165	29%	19.8	1.71	0.000	[0.13 – 0.50]
(4) Girolandos	385	12%	0.69	2.49	0.405	[0.40 – 1.44]
Nº de lactação						
(1) 1º lactação*	220	35%	-	-	-	-
(2) 2º Lactação	220	18%	16.9	2.50	0.000	[1.57 – 4.00]
(3) 3º Lactação	330	14%	33.7	3.31	0.000	[2.14 – 5.16]
(4) >3º Lactações	110	16%	12.4	2.75	0.000	[1.50 – 5.20]
Prod leiteira kg/ano						
(1) < 1500*	220	36%	-	-	-	-
(2) > 1500 < 3000	495	16%	36.7	3	0.000	[2.05 – 4.40]
(3) > 3000	165	12%	27.2	3.90	0.000	[2.24 – 7.03]
<i>R. microplus</i>						
(1) Leve*	65	54%	-	-	-	-
(2) Moderado	312	30%	52.6	2.70	0.000	[0.17 – 0.38]
(1) Alta	503	10%	85.5	10.3	0.000	[0.05 – 0.17]
Densidade animal						
(1) Baixa*	200	74%	-	-	-	-
(2) Média	560	54%	149.6	2.61	0.000	[0.08 – 0.17]
(1) Alta	320	12%	212.4	22.3	0.000	[0.03 – 0.07]

* Valor referência, N= número de amostras avaliadas, P(%)= prevalência de soropositivos para *Anaplasma marginale*, χ^2 = qui-quadrada, OR= Odds ratio, IC 95%= intervalo de confiança

Durante o periparto, a prevalência de animais soropositivos para *A. marginale* foi de 20,4%, caracterizando este período como de alto risco para a ocorrência de anaplasmoses. Em função dos baixos títulos de anticorpos circulantes, este período foi caracterizado como de instabilidade endêmica para *A. marginale*.

Pela análise bivariada observou-se que na semana do parto os animais apresentaram uma redução significativa ($p < 0.05$) do título de anticorpos circulantes. Neste período existiu 2,61 vezes mais chance dos animais serem soronegativos para *A. marginale* do que no pré-parto e 4,33 vezes em relação ao pós-parto. Observou-se uma maior frequência de animais soropositivos durante a estação chuvosa (27%) do que na estação seca (14%). A chance de uma vaca ser soropositiva foi 2,3 vezes maior durante o período chuvoso em relação ao período seco.

O padrão racial influenciou diretamente os títulos de anticorpos contra *A. marginale*. Os animais *B. taurus* possuíam 6,52 vezes mais chance de serem soronegativos do que animais *B. indicus*. Entre os animais mestiços, observou-se que os animais F1 apresentaram 2,96 vezes mais chances de serem negativos do que os animais Girolandos. Também foi observado que o título de anticorpos dos animais Girolandos foram mais próximas dos animais *B. taurus* do que dos animais *B. indicus*, onde os animais Girolandos não diferiram estatisticamente dos animais *B. taurus* ($p = 0.405$; $OR = 0.78$) e mantiveram-se com maior chance de serem soronegativos do que os *B. indicus* ($p < 0.05$; $OR = 5.06$).

Os animais de alta e média produção leiteira apresentaram 3,9 e 3 vezes mais chance de serem soronegativos do que os animais de baixa produção. A idade influenciou na soroprevalência para *A. marginale*, pois as fêmeas primíparas foram mais protegidas do que as pluríparas. Em relação às vacas primíparas, as vacas de 2º lactação apresentaram 16,9 % vezes mais chance de serem soronegativas, as de 3º lactação apresentaram 33,7 vezes e as de 4º ou mais lactações apresentaram 12,4 vezes.

A densidade animal demonstrou facilitar a transmissão do agente no rebanho, pois sob alta lotação a chance de ser soropositivo foi 22,3 vezes maior do que sob baixa lotação. Por fim, a densidade do vetor *R. microplus* apresentou relação direta com a frequência de animais soropositivos, sendo que os animais menos parasitados apresentaram 10,3 vezes mais chance de serem soronegativos do que os animais com escore de infestação alta.

Os resultados da análise multivariada estão representados abaixo (Tabela 5). Neste modelo apenas as variáveis, raça ($p < 0.012$), produção leiteira ($p < 0.000$), infestação por *R. microplus* ($p < 0.019$) e densidade animal ($p < 0.004$) permaneceram significantes. O modelo de regressão logística demonstrou que animais *B. indicus* têm duas vezes mais chance ($OR = 2,41$) de possuírem anticorpos para *A. marginale* do que animais *B. taurus*. Assim, embora a chance de possuir anticorpos tenha diminuído de 6,52 no modelo bivariado para 2,41 no modelo multivariado, os animais *B. taurus* permaneceram muito mais suscetíveis a anaplasmoses.

Animais altamente infestados por *R. microplus* apresentaram duas vezes mais chance ($R = 2,11$) de serem soropositivos para *A. marginale* do que animais com baixa infestação. Porém, no modelo simples os animais com alta infestação por carrapatos apresentaram 10 vezes mais chance ($OR = 10.2$) de serem soropositivos, demonstrando a existência da interação entre variáveis e conseqüentemente, a necessidade de uma análise multivariada para esclarecer a importância de cada fator na ocorrência da doença.

Tabela 5. Modelo final da regressão logística para frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* em vacas durante o periparto, Pesagro-Rio, Brasil, 2008-2010.

Fator	Categoria	OR	p-valor	IC 95%
Peri-parto	pré-parto*	-	-	-
	Parto	1.07	0.839	[0.552 - 2.074]
	pós-parto	0.80	0.284	[0.535 - 1.200]
Sazonalidade	Seca*	-	-	-
	Chuva	0.72	0.067	[0.513 - 1.023]
Raça	<i>B. taurus</i> *	-	-	-
	F1	1.02	0.929	[0.582 - 1.807]
	Girolando	1.68	0.080	[0.939 - 3.014]
	<i>B. indicus</i>	2.41	0.012	[1.209 - 4.816]
Nº Lactação	1º lactação*	-	-	-
	2º Lactação	1.22	0.390	[0.776 - 1.911]
	3º Lactação	1.18	0.477	[0.740 - 1.897]
	4º Lactações	0.87	0.577	[0.548 - 1.397]
Produção leiteira	< 1500*	-	-	-
	>1500 < 3000	0.98	0.900	[0.621 - 1.572]
	> 3000	0.219	0.000	[0.107 - 0.447]
<i>R. microplus</i>	Leve*	-	-	-
	Moderado	1.66	0.019	[1.085 - 2.556]
	Alta	2.11	0.020	[1.122 - 3.951]

OR= Odds ratio, IC 95%= intervalo de confiança

Por fim, a terceira variável que demonstrou significância no modelo final foi a densidade animal. No modelo simples os animais mantidos em alta densidade apresentaram 22,3 mais chance de serem soropositivos quando comparados com animais mantidos sob baixa densidade. Porém, no modelo final essa chance diminuiu para 3,28.

Das sete variáveis avaliadas no modelo inicial três apresentaram significância no modelo final. Esses resultados demonstraram que animais *B. taurus* mantidos sob alta densidade animal e conseqüentemente, altamente infestados por carrapatos, representam um grupo de risco para a ocorrência de anaplasmose. Por tanto, esses animais devem constituir o grupo prioritariamente observado dentro de uma propriedade localizada em área endêmica para a anaplasmose.

Embora a propriedade estudada esteja localizada em uma área de estabilidade endêmica para *A. marginale*, os títulos de anticorpos observados demonstraram instabilidade para anaplasmose. Segundo D'Andrea et al. (2006), uma área de estabilidade pode se tornar instável por certos procedimentos de manejo como, por exemplo, excesso de combate ao *R. microplus* ou mesmo quando sua população é naturalmente escassa, provocando um baixo inóculo do agente e conseqüentemente baixa imunidade. Os resultados do estudo corroboram com observações de D'Andrea et al. (2006), pois o número de animais soropositivos entre as vacas altamente infestadas foi significativamente ($p < 0.05$) maior do que entre as vacas com baixa infestação.

O presente estudo foi realizado em rebanho fechado, onde não são introduzidos animais de outros plantéis, assim não houve risco de inserir no plantel um animal parasitado por *R. microplus* infectado por *A. marginale* proveniente de área endêmica ou mesmo inserir animais provenientes de área indene, sem imunidade para o agente. Além disso, um rigoroso controle de carrapatos pela utilização de carrapaticidas é adotado na propriedade. Assim, acreditamos que a união destas duas práticas durante anos seja uma

das explicações pela baixa prevalência do agente. Mesmo os animais classificados com alta infestação apresentaram número de carrapatos inferior ao observado em outras áreas endêmicas (por exemplo Pacheco et al., 2004).

A suscetibilidade às doenças infecciosas geralmente é um fenômeno multifatorial, no qual características distintas podem ser reconhecidas, entre estas está a reatividade imunológica do hospedeiro (DETILLEUX et al., 1995; ROCHE et al., 2000). Além da gestação, fatores como estação do ano, idade, lactação e densidade de vetores também demonstram afetar significativamente os valores hematológicos de vacas leiteiras (BONIZZI et al., 2003) e conseqüentemente a resposta imune frente aos parasitas.

Os resultados do presente estudo corroboram dados de Rodríguez et al. (2009) que observaram que a suscetibilidade a *A. marginale* varia com a raça, sexo, idade e estado fisiológico do animal. Estes autores também observaram que as perdas variam de acordo com a presença de carrapatos, uso de acaricidas, outras doenças parasitárias e uma série de fatores diversos, incluindo a presença de babesiose.

Embora alguns estudos tenham demonstrado diferenças nas concentrações séricas de globulina entre bovinos leiteiros de diferentes faixas etárias, nenhuma diferença foi associada à época ou fase da gestação. Porém, Bonizzi et al. (1989) observaram relação inversa na concentração de globulinas no soro e a gestação, e uma correlação positiva foi encontrada entre idade e níveis séricos de globulinas. Estes resultados corroboram o presente estudo, visto que no parto a titulação de anticorpos foi menor, provavelmente em função da passagem passiva destes para o colostro (SASAKI et al., 1976). Além disso, a estação do ano também demonstra influência sobre a resposta imune humoral, provavelmente em função da densidade de vetor (MAGONA et al., 2008).

O número de vacas soropositivas para *A. marginale* em função do parto está representado abaixo (Figura 16). Na 5ª semana anterior ao parto, 25 animais encontravam-se soropositivos (31,25%), na semana do parto seis animais (7,5%) e na quinta semana após o parto 35 animais (43,75%).

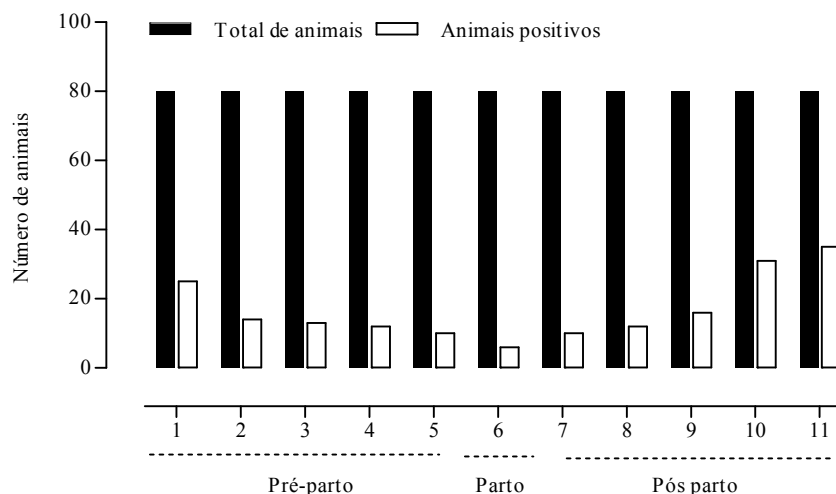


Figura 16. Número de animais soropositivos para *Anaplasma marginale* durante as cinco semanas do pré-parto, semana do parto e durante as cinco semanas do pós parto, Pesagrorio, 2008-2010.

Há evidências substanciais em bovinos leiteiros que o mecanismo de defesa inata e adquirida são prejudicados durante o periparto, quando a ocorrência da doença é maior (KEHRLI et al., 1989a; 1989b; MALLARD et al., 1998a). Moraes et al. (1997)

quantificaram a evolução das concentrações de globulinas séricas em vacas da raça holandesa no período de 28 dias anteriores ao parto até 28 dias após o parto e observaram uma queda nos níveis séricos de imunoglobulinas no período entre 14 dias antes do parto até 7 dias pós-parto. Em seguida, foi observado um aumento da concentração de imunoglobulinas até atingir os mesmos níveis observados 28 dias antes do parto. A diminuição da quantidade de imunoglobulinas no sangue das vacas durante o periparto foi explicada por Sasaki et al. (1976), justificando que esse fato ocorre em função da transferência maciça destas para o colostro no período que antecede o parto.

Como constatado no presente estudo, Brandom et al. (1971) notaram que o nível de imunoglobulinas alcança máxima concentração na glândula mamária e uma máxima diminuição na circulação sanguínea materna 2 a 3 semanas antes do parto. Porém, há relato de que a transferência máxima de imunoglobulinas da corrente sanguínea para a glândula mamária ocorre na semana pré-parto (WTNGER et al., 1995).

Durante as semanas próximas ao parto foi observado uma redução significativa ($p < 0.05$) dos títulos de anticorpos da classe IgG contra *A. marginale*. Observou-se efeito quadrático do parto, indicando que duas semanas antes do parto até duas semanas após o parto os animais são altamente vulneráveis a infecção por *A. marginale*, porém, logo em seguida, os animais apresentam uma recuperação significativa dos níveis de imunoglobulinas. Esses resultados são semelhantes aos observados por Pacheco et al. (2004), que detectaram uma queda significativa nos títulos de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale* durante o último mês de gestação em grande parte das vacas.

Em bovinos, a formação do colostro acontece principalmente durante as quatro semanas que antecedem o parto, período no qual ocorre a migração das imunoglobulinas presentes na corrente sanguínea da mãe para a glândula mamária. O processo de transporte é seletivo, predominando a transferência de IgG e, mais especificamente, IgG1. A passagem ocorre através das células alveolares e, aparentemente, está envolvida com a presença de receptores na membrana das mesmas (LARSON et al., 1980).

Em bovinos de leite, provavelmente em função da especialização, já foi demonstrado que a migração de imunoglobulinas séricas para a glândula mamária, durante a formação do colostro, determina uma queda de concentração desta proteína na corrente sanguínea, nas últimas semanas pré-parto (LARSON; KENDALL, 1957; LARSON; HAYS, 1958; DIXON et al., 1961). Por outro lado, em vacas Nelore, este decréscimo na concentração de imunoglobulinas séricas não foi verificado (MACHADO NETO; d'ARCE, 1979). Os autores sugerem que este fato pode estar relacionado com a característica de baixa produção de leite desta raça, que conseqüentemente estaria associada a uma menor atividade secretora da glândula mamária, demandando uma mobilização menor de anticorpos séricos.

4.5.1 Sazonalidade

Embora durante o período seco tenha sido observado um menor número de animais soropositivos em relação ao período chuvoso, observou-se que o animal com o maior valor de densidade óptica (DO 345) pariram na estação seca.

Embora não existam muitos estudos que façam associação entre variáveis climáticas com a resposta imune contra *A. marginale*, neste estudo foi possível realizar algumas associações. A maior frequência de animais soropositivos durante o período chuvoso pode estar associado a maior densidade do vetor. No entanto, não foi observada diferença significativa ($p > 0.05$) da soroprevalência de *A. marginale* em função da estação do ano. Estes resultados foram diferentes dos achados de Pérez et al. (1994b) que observaram na época chuvosa maior ocorrência de casos clínicos de anaplasmose. Pérez et al. (1994b) observaram que a soropositividade aumentou durante o período chuvoso,

talvez, associada ao aumento da população de vetores. Porém, no presente estudo não foi observada alteração significativa ($p > 0.05$) da população de carrapato ao longo do ano, provavelmente em função das condições climáticas na estação seca e chuvosa terem se mantido dentro de uma faixa ideal para a sobrevivência de *R. microplus*.

Neste estudo, embora não tenha sido observado diferença entre a densidade de vetor em função da estação do ano, o maior contato dos animais com o agente *A. marginale* pode ser em função dos animais serem mantidos sob uma maior densidade animal neste período e com isso a transição de *R. microplus* entre um animal e outro ser maior.

4.5.2 Padrão racial

Na Austrália, Wilson et al. (1980a, b) e Otim et al. (1980) não encontraram nenhuma diferença na suscetibilidade entre as espécies *B. taurus* e *B. indicus* a *A. marginale*. Porém, Parker et al. (1985) observaram que animais zebuínos são mais resistentes a *A. marginale* do que taurinos. Eles descobriram que a rickettsemia e a depressão são ligeiramente superiores nos animais *B. taurus* em relação aos *B. indicus*.

O estudo de Bock et al. (1997a), no qual quatro grupos de 10 bovinos (100% de *B. indicus*, 50% de *B. indicus*, 25% de *B. taurus* e 100% de *B. taurus*) infectados com isolados virulentos de *A. marginale*, indicou que todos os genótipos foram sensíveis à infecção por *A. marginale*. Dentre os animais, 5/10 100% *B. indicus*, 7/10 50% *B. indicus*, 8/10 25% *B. indicus* e 10/10 100% *B. taurus* necessitaram de tratamento contra *A. marginale*. Os autores concluíram que se expostas a *A. marginale*, todas as raças de bovinos estão em risco grave de desenvolver a doença. No entanto, quanto mais sangue *B. taurus* tiver o animal maior o risco de desenvolver quadros clínicos de anaplasmoses.

4.5.3 Número de lactações

Todos os grupos de animais apresentaram queda significativa ($p < 0,05$) da fração imunoglobulina durante o período estudado. Estes resultados são semelhantes aos observados por Larson e Kendall (1957), Larson e Hays (1958) e Dixon et al. (1961). Uma fonte de variação dos níveis de imunoglobulinas no colostro diz respeito à experiência reprodutiva, sendo que as vacas primíparas geralmente produzem colostro de qualidade inferior, tanto no que diz respeito a concentração quanto na variedade dos anticorpos que veicula (ELFSTRAND et al., 2002). Assim, acreditamos que vacas de 1º lactação, por passarem uma menor quantidade de anticorpos via colostro, acabam mantendo circulante uma maior quantidade de imunoglobulinas.

Na literatura, são raros os trabalhos que avaliam a influência do número de lactações sobre a frequência de anticorpos contra *A. marginale*. Porém, Fraga et al. (2003) observaram efeito quadrático da idade sobre a infestação por *R. microplus*. Sendo este o mais importante vetor para a anaplasmoses no Brasil, pode ser feita uma correlação direta entre a densidade de carrapatos e a título de anticorpos.

4.5.4 Produção leiteira

A maior frequência de animais soropositivos foi observada nos animais de baixa produção, seguida pelos animais de moderada e alta produção. Além disso, observou-se que os animais que apresentaram reação mais forte foram os de baixa produção, ao passo que os poucos animais de alta produção que reagiram positivamente, mantiveram-se próximos aos valores referenciais da linha de corte.

Na literatura, a associação entre o desempenho leiteiro e o estado de saúde das vacas ainda não está bem claro. Em um estudo na Noruega, durante três décadas, Solbu (1983) observou aumento proporcional do número de tratamentos veterinários em

fazendas de alta e média produção leiteira. Em contraste, em estudo na Dinamarca, Enevoldsen et al. (2003) não demonstraram, ao longo do tempo, aumento na incidência de doenças em função da produção leiteira.

Após uma vasta revisão realizada por Erb (1987) sobre a associação de características produtivas e ocorrência de doenças, alguns estudos epidemiológicos, bem como uma série de grandes estudos genéticos e fenotípicos, têm sido relatados. Embora o colostro produzido por raças de baixa produção seja mais concentrado em termos de imunoglobulinas, o volume total, em consequência da quantidade de colostro produzido, é maior em vacas de alta produção. Essas diferenças são impostas, principalmente, pelo volume de colostro produzido e pela capacidade seletiva das células do epitélio secretor no transporte de IgG do sangue para o colostro (GUY et al., 1994). Segundo Besser; Gay (1993) produções acima de 8 a 9 kg de colostro correlacionam-se com baixos níveis de anticorpos nessa secreção.

Em vacas de leite, em função da especialização, foi demonstrado que a migração de imunoglobulinas séricas para a glândula mamária, durante a formação do colostro, determina uma queda de concentração desta proteína na corrente sangüínea, nas últimas semanas pré-parto (LARSON; KENDALL, 1957; LARSON; HAYS, 1958; DIXON et al., 1961). Por outro lado, baseado em uma revisão de 11 estudos epidemiológicos e 14 de genética, Ingvarsen et al. (2003) encontraram pouca evidência que vacas de alta produção têm maior risco de desenvolver doenças do que vacas de média e baixa produção.

Embora as maiores produtoras de leite apresentem 21% a mais de custo com saúde, essas são mais rentáveis ao proprietário (BERTRAND et al., 1985). Neste estudo, os autores demonstraram claramente haver a necessidade de um trabalho adicional para determinar a influência genética sobre a resposta imune às doenças. Esta necessidade se sustifica em função das vacas taurinas serem as mais produtivas e possíveis interações entre a genética e a imunidade em estudos anteriores. Wagter et al. (2003) verificou que a seleção de animais através da resposta imune pode ser uma saída benéfica para a saúde do rebanho, mantendo um rendimento produtivo ideal e minimizando a ocorrência de doenças.

4.5.5 Infestação por *Rhipicephalus microplus*

Entre os animais com escore de infestação alto, observou-se que 74% destes animais foram soropositivos, ao passo que entre os animais de médio e baixo escore de infestação a frequência de soropositivos foi de 54% e 12%, respectivamente. Essa discrepância na soropositividade em função da densidade de vetor no animal demonstra a importância deste carrapato na transmissão de *A. marginale*.

O presente resultado corrobora Coleman et al. (2001) que observaram correlação entre o aumento da densidade de infestação de *Rhipicephalus* spp. sobre os bovinos e a diminuição no risco de infecção por *A. marginale*. Esta tendência de risco de soroconversão provavelmente está atribuída ao aumento da infecção associado com a densidade crescente carrapato, o que conseqüentemente está associado com diminuição da proporção de gado suscetível à infecção por *A. marginale* dentro da população.

É possível que, no rebanho estudado as práticas de controle de carrapatos resulte em baixa população de vetores, insuficiente para manter constante a transmissão de *A. marginale* (MAHONEY; ROSS, 1972; PÉREZ et al, 1994b; GUGLIELMONE, 1995). Neste caso, um desequilíbrio causado pela relação parasita-hospedeiro devido à transmissão infrequente cria uma condição de instabilidade endêmica artificial, onde casos clínicos podem ocorrer sazonalmente coincidindo com o período de atividade máxima do vetor (MAHONEY; ROSS, 1972; PÉREZ et al, 1980).

Especificamente durante o periparto, Pacheco et al. (2004) observaram que os níveis séricos de anticorpos contra *A. marginale* caíram e permaneceram assim por até 60 dias após o parto. Estes mesmos autores observaram que a intensidade da infestação pelo *R. microplus* não influenciou nos níveis médios de parasitemia que oscilaram entre 0,1 e 1,1%, considerados subparasitêmicos e persistentes em animais portadores sãos de *A. marginale* (ERIKS et al., 1989). Isso explicaria alguns surtos de anaplasmose que ocorrem em vacas no periparto, as quais não foram parasitadas pelo agente e apresentaram altos títulos de anticorpos.

4.6 Títulos de Anticorpos Tipo IgG anti-*A. marginale* em Função do Estado Fisiológico

Foi observada influência significativa ($p < 0.05$) do estado fisiológico sobre a soropositividade para *A. marginale*. A prevalência de *A. marginale* nas vacas secas foi de 30% (60/200), sendo observado aumento não significativo ($p > 0.05$) para 35% (70/200) durante a gestação. Porém, durante a lactação a soropositividade aumentou substancialmente para 60% (120/200). Além do baixo percentual de animais soropositivos, observou-se que estes foram pouco reativos através do ensaio imunoenzimático indireto (Figura 17).

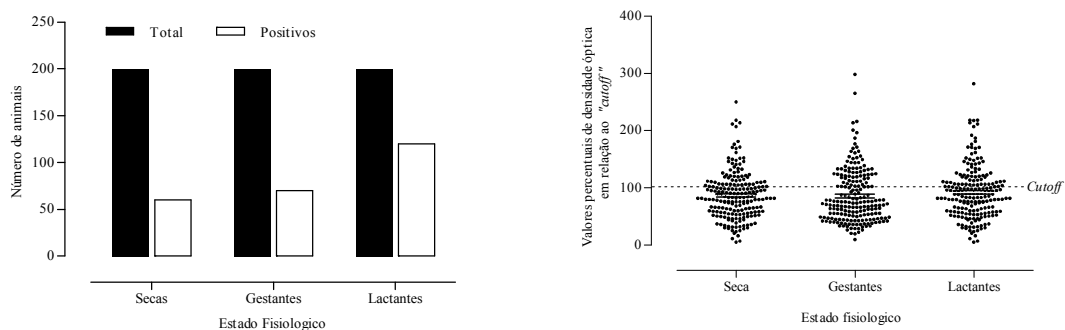


Figura 17. Número de animais soropositivos e índices das densidades ópticas dos soros em relação ao linha de corte (DOx100/ linha de corte) obtidas do ensaio imunoenzimático indireto para *Anaplasma marginale* em vacas com secas, gestantes e lactantes, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Liberg (1977) observou que, embora as diferenças nas concentrações séricas de globulina nos rebanhos leiteiros, individuais e entre os grupos etários, tenham sido pronunciadas, não foram associadas com o estado fisiológico. Heuer et al. (1999) mesmo não tendo avaliado diretamente a influência do estado fisiológico sobre a resposta imune humoral, verificaram relação inversa entre a produção de leite e a concentração de imunoglobulinas e correlação positiva entre os níveis séricos de imunoglobulinas e a idade. Assim, atualmente não estão claros quais fatores influenciam na concentração de imunoglobulinas, sendo necessário avaliar diversas variáveis como pré-analíticas na interpretação das concentrações de globulina sérica em bovinos de leite.

Ao avaliar o periparto isoladamente, observa-se que durante esta fase o número de animais soropositivos para *A. marginale* foi significativamente inferior ($p < 0.05$) às demais fases. Observou-se que durante a gestação o animal tem 2,1 vezes mais chance de ser soronegativo, seca 2,7 e periparto 4,5 (Tabela 6). Portanto, durante o periparto ocorre uma redução dos níveis séricos de anticorpos, provavelmente devido à transferência passiva destes para o colostro. Durante a lactação, os animais são mais desafiados,

provavelmente em função de uma maior densidade animal e maior infestação por carrapatos e, por isso existe um maior número de animais soropositivos.

Tabela 6. Avaliação do estado fisiológico como fator de risco para a frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* por χ^2 , Pesagro-Rio, 2008-2010.

Fator de risco	N	P(%)	χ^2	OD	P-valor	IC95%
Estado Fisiológico						
(1) Periparto*	880	20%	-	-	-	-
(2) Seca	200	30%	8.6	0.61	0.003	[0.42 – 0.86]
(3) Gestante	200	35%	19	0.48	0.000	[0.34 – 0.68]
(4) Lactante	200	60%	38	0.22	0.000	[0.12 – 0.38]

* Valor referência, N= número de amostras avaliadas, P(%)= prevalência de soropositivos para *Anaplasma marginale*, χ^2 = qui-quadrada, OR = Odds ratio, IC 95%= intervalo de confiança

Segue abaixo o modelo final da regressão logística multivariada para frequência de anticorpos da classe IgG contra *Anaplasma marginale* em vacas em função do estado fisiológico (Tabela 7).

Tabela 7. Modelo final da regressão logística multivariada para frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* em vacas em função do estado fisiológico, Pesagro-Rio, Brasil, 2008-2010.

Fator	Categoria	OR	p-valor	IC 95%
Estado Fisiológico	Seca*	-	-	-
	Gestante	1.94	0.009	[1.174 - 3.231]
	Lactante	5.10	0.000	[3.054 - 8.532]
Raça	<i>B. taurus</i> *	-	-	-
	F1	2.69	0.108	[0.888 - 3.235]
	Girolando	2.96	0.000	[1.634 - 5.374]
Nº Lactação	<i>B. indicus</i>	5.21	0.000	[2.797 - 9.707]
	1º lactação*	-	-	-
	2º Lactação	0.63	0.097	[0.371 - 1.086]
	3º Lactação	0.12	0.000	[0.068 - 0.243]
Produção leiteira	4º Lactações	0.14	0.000	[0.078 - 0.265]
	< 1500*	-	-	-
	>1500 < 3000	0.64	0.086	[0.392 - 1.064]
<i>R. microplus</i>	> 3000	0.37	0.001	[0.208 - 0.693]
	Leve*	-	-	-
	Moderado	0.61	0.053	[0.369 - 1.007]
Densidade animal	Alta	0.75	0.406	[0.386 - 1.469]
	Baixa*	-	-	-
	Média	1.18	0.982	[0.560 - 1.889]
	Alta	3.28	0.004	[2.528 - 3.219]

OR= Odds ratio, IC 95%= intervalo de confiança

O modelo de regressão logística demonstrou que tanto a gestação quanto a lactação influenciaram significativamente ($p < 0.05$) na soropositividade dos animais.

Animais *Bos indicus* apresentaram 5,21% vezes mais chance de serem soropositivos do que animais *B. taurus*. Animais de 1º lactação apresentaram 88% mais chance de serem soropositivos do que animais de 2º lactação, animais com baixa produção leiteira 63% em relação aos animais de alta produção e animais com baixa infestação por carrapatos 39% mais chance do que animais com infestação moderada. Curiosamente os animais com moderada infestação apresentaram 14% mais chance de serem soropositivos para *A. marginale* do que os animais de alta infestação por carrapatos.

Os mecanismos de defesa inata e adquirida em bovinos estão reduzidos durante o parto (MALLARD et al., 1998a). Esta capacidade de resposta reduzida inclui alterações na imunidade sistêmica e, físicas e metabólicas da gravidez, parto e lactação, que contribuem substancialmente para diminuição da resistência e aumento da incidência de doenças infecciosas durante o parto. As concentrações séricas de globulinas podem fornecer uma indicação do status humoral do animal, um componente do sistema de defesa do organismo.

Em gado leiteiro, foi encontrada influência genética significativa sobre os níveis séricos de imunoglobulinas (BURTON et al., 1989). Porém, um estudo anterior no mesmo rebanho não revelou diferenças entre parâmetros imunológicos durante meados da lactação sobre a produção leiteira (KEHRLI et al., 1991b). Possivelmente, as diferenças que existem entre as linhagens de vacas para alta produção leiteira são maiores apenas durante o parto, quando a incidência de estresse e doença são maiores.

Segundo Chorfi et al. (2004), embora a concentração média de globulinas totais e IgG tenham sido menores em vacas lactantes do que em vacas secas, não foi observado diferença significativa. O animal em lactação torna-se novamente suscetível para os efeitos da infecção, bem como uma significativa fonte de contaminação do meio ambiente para sua prole ingênua.

4.6.1 Padrão racial

Independente do estado fisiológico, observou-se que, quanto maior o grau de sangue *B. taurus* maior a suscetibilidade do animal a *A. marginale* (Tabela 7). As maiores concentrações de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale* em todas as raças foram observadas durante a lactação. Porém, mesmo os animais *B. indicus* durante a lactação apresentaram condições imunológicas propícias para a ocorrência de anaplasiose. Embora todos os animais estejam em estado de risco para ocorrência de anaplasiose, atenção especial deve ser dada aos animais durante o parto, visto que os títulos de anticorpos foram extremamente baixos. Porém, menores títulos de IgG foram observados nas vacas *B. taurus* secas, sendo a frequência de animais soropositivos igual a 8%.

Embora tenha sido observada uma redução significativa do número de animais soropositivos da gestação para o parto, como consequência da transferência passiva de anticorpos, observou-se aumento significativo ($p > 0.05$) na lactação. Alguns animais soronegativos durante a gestação tornaram-se soropositivos na lactação.

A suscetibilidade de bovinos *B. indicus* e seus cruzamentos para a infecção com *A. marginale* é semelhante aos bovinos *B. taurus* (JONSSON et al., 2008). Em rebanhos de bovinos *B. indicus* e seus cruzamentos a taxa de infecção de *A. marginale* é reduzida pois os carrapatos estão menos propensos a infestar os animais pela diminuição do número de carrapatos no campo (efeito a longo prazo sobre a população decorrente da alta resistência do hospedeiro) e por uma menor proporção de carrapatos que se desenvolvem para se alimentar em bovinos infectados e por sua vez, ser infectado (devido à menor parasitemia) (JONSSON et al., 2008).

A frequência de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale* apresentou um perfil clássico em todos os grupos genéticos estudados. As titulações de anticorpos foram

baixas nas vacas secas, apresentando um aumento durante gestação e, um decréscimo abrupto durante o parto. Durante a lactação os animais apresentaram um aumento progressivo da titulação de IgG, sendo observado nesse estado fisiológico os maiores valores.

Diversos estudos foram realizados para determinar a suscetibilidade de bovinos *Bos indicus* e seus cruzamentos à infecção por *A. marginale*. Animais *B. indicus* demonstraram-se sensíveis à anaplasmoze (OTIM et al., 1980; PARKER et al., 1985). Pela inoculação experimental, Wilson et al. (1980a, b) e Otim et al. (1980) demonstraram que bovinos zebuínos e seus cruzamentos são igualmente sensíveis a bovinos taurinos à todos os efeitos de *A. marginale*. Apenas pequenas diferenças foram observadas em resposta à infecção por *A. marginale* entre *B. indicus* (Brahman) e *B. taurus* (Shorthorn) (PARKER et al., 1985). Esses autores descobriram que a rickettsiose é ligeiramente superior em *B. taurus* quando comparado a *B. indicus*, mas os sinais clínicos não diferem entre as raças. Além disso, concluíram que reações graves ocorrem em ambas as raças, sugerindo que, em um situação de campo, zebuínos não apresentam mais resistência a anaplasmoze em comparação a raças europeias.

Porém, Bock et al. (1999c) estudando a suscetibilidade de bovinos taurinos e zebuínos em pastagens infestadas com *R. microplus* infectados com um isolado virulento de *A. marginale*, observaram que embora não tenha havido diferença significativa entre raças na resistência à infecção, existiu uma considerável variação na resistência a *A. marginale* de indivíduos em ambas as raças e a mortalidade foi maior em animais *B. taurus*. Os autores concluíram que, *A. marginale* poderia infectar ambas as raças e seus cruzamentos, porém causa perdas mais consideráveis em raças *B. taurus*.

4.6.2 Número de lactações

A maior frequência de soropositivas foi observada em vacas primíparas (77%) durante a lactação, ao passo que vacas de 3^o lactação durante o parto apresentaram a menor soroconversão (14%). As vacas primíparas apresentaram soropositividade significativamente superior ($p < 0.05$) aos demais grupos, com exceção das vacas de 2^o lactação durante a gestação. A partir da 3^o lactação não foi observada diferença significativa ($p > 0.05$) entre o número de animais positivos em nenhum estado fisiológico. Para todos os grupos, a maior concentração de anticorpos foi observada durante a lactação.

Os resultados observados neste estudo são semelhantes aos observados por Larson e Kendall (1957) Larson e Hays (1958) e Dixon et al. (1961). Segundo estes autores, uma importante fonte de variação dos níveis de imunoglobulinas no colostro diz respeito à experiência reprodutiva, sendo que vacas primíparas geralmente produzem colostro de qualidade inferior (ELFSTRAND et al., 2002). Assim, vacas de 1^o lactação, por passarem uma menor quantidade de anticorpos via colostro, acabam mantendo circulante uma maior quantidade de Imunoglobulinas. O baixo título de anticorpos nos animais mais velhos pode ser creditada a debilidade do sistema imunológico em função da idade.

4.6.3 Produção leiteira

Observou-se que o grupo de alta produção leiteira apresentou menor frequência de animais soropositivos para *A. marginale* em todos os estágios fisiológicos. Durante o parto, os animais de alta produção apresentaram resultados críticos, sendo apenas 4% dos animais soropositivos, demonstrando alto risco de anaplasmoze neste grupo. Os animais de baixa produção, embora tenham apresentado maior frequência de anticorpos circulantes, mantiveram-se em condição de instabilidade endêmica para *A. marginale*.

As vacas com alta produção leiteira apresentaram menores frequências de soropositividade em todos os estágios fisiológicos. Por outro lado, as vacas de baixa produção apresentaram o maior percentual de animais soroconvertidos. Kitchenham et al. (1975) observaram relação inversa entre produção leiteira e concentração de imunoglobulinas.

Besser e Gay, (1994) e Guy et al. (1994) observaram que, animais de alta produção se caracterizam, de um modo geral, por apresentarem níveis globais mais elevados de IgG em seus colostros do que animais de baixa produção. Em vacas de leite, em função da especialização, já foi mostrado que a migração de imunoglobulinas séricas para a glândula mamária, durante a formação do colostro, determina uma queda de concentração desta proteína na corrente sanguínea, nas últimas semanas pré-parto (LARSON; KENDALL, 1957; LARSON; HAYS, 1958; DIXON et al., 1961). Por outro lado, Ingvarstsen et al. (2003) encontraram pouco evidência que vacas de alta produção têm maior risco de desenvolver doenças do que vacas de média e baixa produção.

4.6.4 Infestação por *Rhipicephalus microplus*

Entre os animais com baixa infestação por *R. microplus* a maior prevalência de *A. marginale* foi de 24% durante lactação. Entre os animais com alta infestação, tanto as vacas secas quanto as gestantes apresentaram 100% de soropositividade e as lactantes 90%. Durante o parto, independente do grau de infestação por *R. microplus*, as vacas apresentam menos de 75% de positividade, tornando-se propensas a ocorrência de casos clínicos de anaplasmose.

Neste estudo, diversos fatores demonstraram afetar a soroprevalência para *A. marginale*. Porém, dentre estes, o estado fisiológico e a densidade de carrapatos foram os fatores que apresentaram maior associação. Estas observações são importantes, pois a anaplasmose é uma doença de causa multifatorial, assim a identificação de fatores chave na ocorrência da doença é de grande validade e pode fornecer subsídio para a implementação de novas medidas de controle. Os valores percentuais de densidade óptica em função do estado fisiológico e infestação por *R. microplus* estão representados na figura abaixo (Figura 49).

O aumento da densidade de *R. microplus* foi associada com uma diminuição no risco para a ocorrência de anaplasmose. Esta tendência de risco de soroconversão provavelmente está associada ao aumento da transmissão do agente para os animais do rebanho, sobretudo para os mais jovens, os quais constituem uma imunidade celular (COLEMAN et al., 2001).

É possível que nos rebanhos estudados as práticas de controle de ectoparasitas (exclusivamente acaricida e inseticidas) resultam em uma baixa população de vetor, insuficiente para manter constante a transmissão de *A. marginale* (MAHONEY; ROSS, 1972; PÉREZ et al., 1994b; GUGLIELMONE, 1995). Neste caso, um desequilíbrio causado pela relação parasita-hospedeiro devido à transmissão infrequente cria uma artificial condição de instabilidade endêmica, onde ocorrem casos clínicos sazonalmente coincidindo com o período de atividade máxima dos vetores (MAHONEY; ROSS, 1972; PÉREZ et al., 1980).

A contagem do número de *Rhipicephalus appendiculatus* e *Rhipicephalus (Boophilus)* spp. foi utilizada por Ogden et al. (2005) para fazer associação destes vetores com a prevalência de varios patógenos. Segundo Swai et al. (2005) em análises univariada, o número de *R. appendiculatus* adulto apresentou associação significativa com uma maior probabilidade de que um animal apresentasse soroconversão para *A. marginale* (coeficiente = 0,039 e $P < 0,01$). Quando esta mesma análise foi feita para *R. microplus* não foi observada associação significativa para este agente.

4.6.5 Densidade animal

Quando os animais foram mantidos em pastagem sob baixa densidade foi observada soropositividade para *A. marginale* igual a 20% (10/50), média densidade 50% (25/50) e alta densidade 70% (35/50) (Figura 18).

Embora a soroprevalência para *A. marginale* tenha variado significativamente em função da densidade animal, mesmo sob alta densidade, a área estudada caracterizou-se como de instabilidade endêmica. O presente estudo corrobora Rodríguez-Vivas et al. (2004) que observaram soroprevalência para *A. marginale* maior nos animais mantidos sob densidade superior a 1 animal/ha (OR=10.94). Pérez et al. (1994a), consideram que a alta densidade animal foi o fator que mais contribuiu para a alta soroprevalência de *A. marginale* em estudos realizados na Califórnia, Sul da Nova Zelândia e Costa Rica.

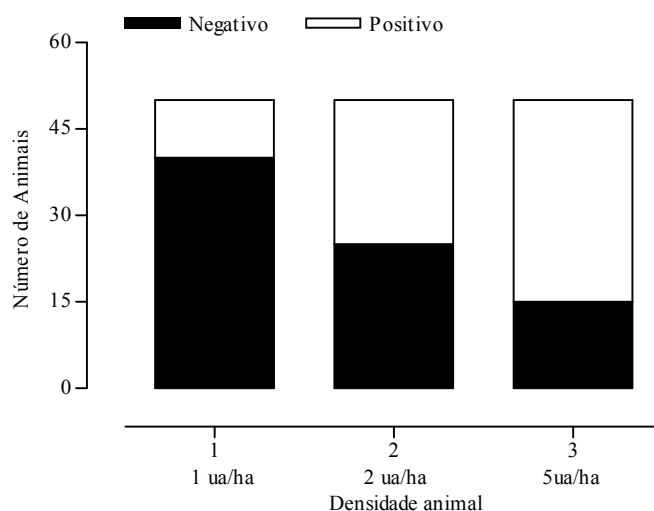


Figura 18. Número de vacas soropositivas mantidas sob baixa, moderada e alta densidade animal, obtidos através do ensaio imunoenzimático indireto para *Anaplasma marginale*, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Os vetores de *A. marginale*, incluindo *R. microplus* tem uma alta probabilidade de alimentarem-se em animais suscetíveis e, conseqüentemente, realizar inoculação de grande quantidade de inóculo quando a densidade é alta (GUGLIELMONE, 1995). Assim, embora os fatores ambientais sejam importantes para a epidemiologia da anaplasmose (SWAI et al., 2005), esses devem ser analisados em conjunto com outros fatores, tais como: tipo de pastagens, densidade animal, densidade de vetor e medidas de controle.

4.7 Títulos de Anticorpos Tipo IgG anti-*A. marginale* em Bezerros

O número de bezerras soropositivas variou significativamente ($p < 0.05$) em função da idade, genética e densidade de vetor (Tabela 8). Durante o primeiro ano de vida, a prevalência média de animais soropositivos para *A. marginale* foi baixa (66%), caracterizando esta fase como de risco para a ocorrência de anaplasmose. A soropositividade dos animais recém-nascidos foi baixa (26.0%) provavelmente decorrente dos baixos títulos de anticorpos das matrizes (31.2%) quatro semanas antes do parto.

Tabela 8. Avaliação dos fatores de risco para a frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* por χ^2 , em bezeros, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Fatores de risco	N	P(%)	χ^2	OD	P-valor	IC 95%
Idade						
(1) 0–2 meses*	38	26.0%	-	-	-	-
(2) 3–6 meses	72	28.0%	25	2.11	0.000	[0.29 – 0.60]
(3) 7-12 meses	110	98.0%	1.7	0.01	0.192	[0.80 – 2.86]
(4) 18-24 meses	70	89.0%	63	0.09	0.000	[0.13 – 0.31]
Grau de sangue						
(1) <i>Bos indicus</i> *	69	91.7%	-	-	-	-
(2) Mestiços	69	66.7%	2.1	5.51	0.000	[2.14 – 5.16]
(3) Girolandos	56	72.9%	12.4	4.08	0.000	[1.50 – 5.20]
(4) <i>Bos taurus</i>	68	33.3%	16.9	22.00	0.000	[1.57 – 4.00]
<i>R. microplus</i>						
(1) Leve*	198	68%	-	-	-	-
(2) Moderado	80	75%	1.5	0.69	0.217	[0.36 – 1.28]
(1) Alta	20	75%	0.5	0.70	0.492	[0.18 – 2.11]

* Valor referência, N= número de amostras avaliadas, P(%)= prevalência de soropositivos para *Anaplasma marginale*, χ^2 = qui-quadrada, OR= Odds ratio, IC 95%= intervalo de confiança

No terceiro e quarto mês de idade observou-se uma redução significativa ($p < 0.05$) da título de anticorpos circulantes (7.8%), sendo que nestes meses existiu 32.7 vezes mais chances dos animais serem soronegativos para *A. marginale* do que nos dois primeiros meses de idade. Após um período de baixa concentração de anticorpos circulantes, observou-se um aumento significativo ($p < 0.001$) a partir do quinto mês, sendo que entre o 7-12 meses de idade, existiu 10 vezes mais chances de serem soropositivos do que os animais entre três e seis meses.

Quanto ao fator genético, observou-se influência direta na título de anticorpos. Durante o primeiro ano de idade, as bezerras *B. taurus* possuíam 16.9 vezes mais chances de serem soronegativas para *A. marginale* do que as bezerras *Bos indicus*. Entre os mestiços, não foi observada diferença significativa ($p > 0.05$) nos níveis de anticorpos circulantes. O escore de infestação por *R. microplus* não apresentou relação direta com a frequência de animais soropositivos, embora os animais menos parasitados tenham apresentado maior frequência de soronegativos.

Segue abaixo o modelo final da regressão logística multivariada para a frequência de anticorpos da classe IgG contra *A. marginale* em bezerras (Tabela 9). A idade demonstrou ser uma variável importante na prevalência de anticorpos contra *A. marginale*, sendo os animais entre os três e seis meses de idade mais soropositivos. Animais *B. taurus* apresentaram 36.2 vezes mais chances de não possuírem anticorpos contra *A. marginale*, deste modo, são mais vulneráveis a anaplasnose. Por fim, animais com infestação moderada e alta apresentaram 2.7 e 3.4 vezes mais chances de serem soropositivos do que animais com baixa infestação.

Tabela 9. Modelo final da regressão logística para a frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* em bezerras, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Fator	Categoria	OR	p-valor	IC 95%
Idade	0 – 2*	-	-	-
	3 – 6	0.06	0.000	[0.016 - 0.236]
	7 – 12	0.54	0.361	[0.148 - 2.005]
	18 – 24	0.50	0.300	[0.135 - 1.853]
Raça	<i>B. taurus</i> *	-	-	-
	FI	4.60	0.000	[1.908 - 11.091]
	Girolandos	7.50	0.000	[2.684 - 20.973]
	<i>B. indicus</i>	36.20	0.000	[10.673 - 22.872]
<i>R. microplus</i>	Leve*	-	-	-
	Moderado	2.70	0.000	[11.920 – 22.080]
	Alta	3.44	0.000	[24.081 – 84.780]

OR= Odds ratio, IC 95%= intervalo de confiança

4.7.1 Idade

A soroprevalência foi maior nos animais mais velhos, corroborando com estudos anteriores realizados no Brasil e Costa Rica (PÉREZ et al., 1994b). Animais jovens provavelmente são infectados cedo, mas a falta de reinfestação constante torna os adultos suscetíveis à anaplasmose. Desta forma, a soroprevalência foi menor em animais adultos, os quais apresentaram casos clínicos mais evidentes. É importante esclarecer que na propriedade estudada animais mais jovens não são expostos à infestação por carrapatos, pois são mantidos em estábulos até os 30 dias de idade.

A idade é um fator determinante para a imunidade dos animais para *A. marginale*, uma vez que os animais jovens são mais resistentes à infecção primária (MAHONEY; ROSS, 1972; KOCAN et al., 2003). Segundo Mahoney e Ross (1972), se pelo menos 75% dos bezerros foram expostos à infecção entre 6 a 9 meses de idade, a incidência da doença será muito baixa e um estado de estabilidade endêmica natural existirá.

A soroprevalência de *A. marginale* aumenta com a idade (MALOO et al., 2001; TEMBUE et al., 2011). Madruga et al. (1985) observaram em seus estudos que, três dias após o nascimento 36% dos bezerros são soronegativos para anticorpos anti-*A. marginale*, com redução para 13.3% aos 15 dias de vida. Esses autores relataram que as primeiras riquetsemias foram observadas a partir dos 30 dias de idade, sugerindo uma primo-infecção nos primeiros dias de vida. Neste mesmo estudo, as maiores riquetsemias foram observadas entre 60 e 120 dias de vida.

Segundo Melo et al. (2001), mais de 90% dos bezerros apresentam anticorpos anti-*A. marginale* antes dos 30 dias de idade, sendo que, dos três aos cinco meses, estes valores caem até atingirem um mínimo de 13,6% e a partir dos seis meses de idade, por conta da primo-infecção mais de 96% tornam-se positivos novamente. Na Tanzânia, a soroprevalência para *A. marginale* variou de acordo com a idade, demonstrando um declínio durante as primeiras 18 semanas de vida (SWAI et al., 2005). Neste mesmo estudo, a soroprevalência para *A. marginale* em bezerros de três semanas de idade foi de 57%, entre 11 e 18 semanas 10% e para animais com idade superior a 18 semanas a prevalência variou de 18% a 41% dependendo da época do ano. Estes resultados sugerem um declínio nos anticorpos maternos a partir das três semanas de idade.

É importante esclarecer que, neste estudo como na maioria das propriedades, animais mais jovens não são expostos à infestação por carrapatos pois são mantidos em estábulos. Assim, a idade é um fator determinante na imunidade dos animais para *A.*

marginale, uma vez que os animais jovens são mais resistentes à primeira infecção (MAHONEY; ROSS, 1972; KOCAN et al., 2003).

Em estudo epidemiológico realizado em Moçambique, Tembue et al. (2011) observaram que a frequência de soropositivos com relação a faixa etária foi de 63,2%, 80,0%, 83,1% e 77,3% para animais com menos de 12 meses, de 12 a 24 meses; de 24 a 36 meses e com mais de 36 meses de idade, respectivamente. Os resultados demonstram que como no presente estudo, a idade é um importante fator epidemiológico para avaliar a soroprevalência de *A. marginale* em rebanhos bovinos.

4.7.2 Padrão racial

A genética demonstrou influência direta na concentração de anticorpos da classe IgG contra *A. marginale* em bezerros durante o primeiro ano de vida. Animais *B. taurus* foram significativamente ($p < 0.05$) mais suscetíveis do que animais *B. indicus* e seus cruzamentos. Entre os mestiços, F1 e Girolandos, não foi observada diferença significativa ($p > 0.05$) na soroprevalência de *A. marginale*.

O estudo de Bock et al. (1997a), no qual quatro grupos de 10 bezerros (100% de *B. indicus*, 50% de *B. indicus*, 25% de *B. taurus* e 100% de *B. taurus*) infectados com isolados virulentos de *A. marginale*, indicou que todos os genótipos são sensíveis à infecção por *A. marginale*. Dentre os animais, 5/10 100% *B. indicus*, 7/10 50% *B. indicus*, 8/10 25% *B. indicus* e 10/10 100% *B. taurus* necessitaram de tratamento contra *A. marginale*. Os autores concluíram que, se expostas a *A. marginale*, todas as raças de bovinos estão em risco grave de desenvolver a doença. Porém, quanto mais *B. taurus* for o animal maior o risco de desenvolver quadros clínicos de anaplasmoze.

4.7.3 Infestação por *Rhipicephalus microplus*

Todos os bezerros apresentaram-se na zona de instabilidade endêmica ou zona marginal, sendo assim, a propriedade é altamente propensa a ocorrência de surto de anaplasmoze. Observou-se que os animais com escore de infestação leve foram mais susceptíveis a ocorrência de anaplasmoze, pois a título de anticorpos destes eram significativamente mais baixa durante todo o estudo.

Neste estudo, a instabilidade enzoótica pode ser consequência de um desequilíbrio causado na relação parasita-hospedeiro devido ao baixo parasitismo ou à transmissão infrequente do agente, criando uma artificial condição de instabilidade endêmica. Assim, poderão ocorrer casos clínicos caso a taxa de inoculação do agente aumente (MAHONEY; ROSS, 1972; PÉREZ et al., 1980b).

Mesmo os animais considerados com alto grau de infestação neste estudo (acima de 31 carrapatos/animal) apresentaram soropositividade inferior ao relatado na literatura para bezerros em área endêmica para anaplasmoze (MADRUGA et al., 1985; ARAUJO et al., 1998; SOUZA et al., 2000a). Porém, como os demais estudos epidemiológicos referentes a soroprevalência de *A. marginale* não avaliam o grau de infestação por carrapatos, não é possível afirmar que a instabilidade da região é consequência da baixa infestação dos animais.

No estado do Paraná, Pacheco et al. (2004) observaram que a infestação por *R. microplus* não influenciou os níveis parasitêmicos, tendo estes oscilado entre zero e 1.1% durante o período experimental. Porém, segundo os mesmos autores, ficou evidente que a infecção natural dos bezerros foi dependente da queda dos níveis de anticorpos colostrais e exposição gradativa aos carrapatos observados nesses animais.

Segundo Pacheco et al. (2004), o equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro depende também de um equilíbrio perfeito na natureza, sobretudo referente as mais importantes espécies de vetores. Embora a epidemiologia e as condições ambientais que

favorecem ou desfavorecem o ressurgimento da doença sejam bem conhecidas, estudos regionais demonstram que pequenas alterações de manejo envolvendo os bezerros e os animais adultos podem provocar diferenças significativas na dinâmica da infecção PACHECO et al., 2004).

4.7.4. Relação dos títulos de anticorpos nas matrizes e nos bezerros

A soroprevalência para *A. marginale* nas vacas foi de 40% (8/20) 30 dias antes do parto, 10% (2/20) no dia do parto e 65% (13/20) 30 dias após o parto e nos bezerros foi de 40% (8/20) após o nascimento e ingestão do colostro, 40% (8/20) 60 dias após o nascimento e 10% (2/20) 120 dias após o nascimento (Figura 19).

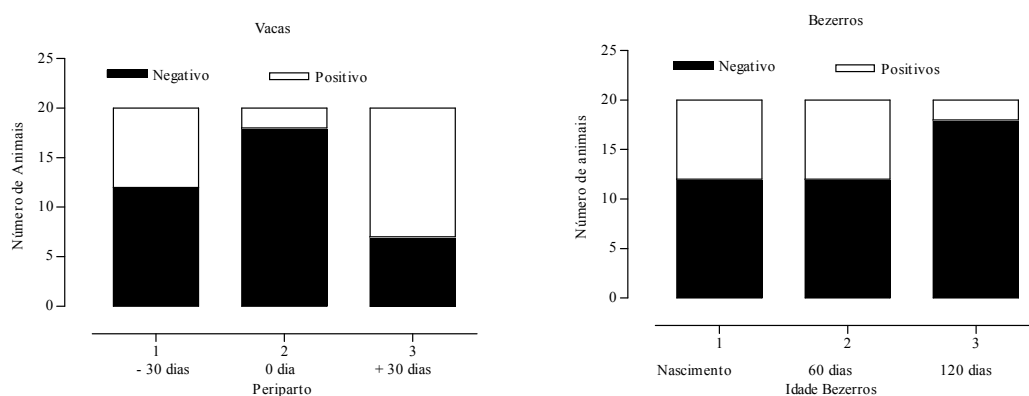


Figura 19. Número de animais soropositivos obtidos através do ensaio imunoenzimático indireto para *Anaplasma marginale* em vacas durante o periparto e bezerros recém nascidos, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Os níveis séricos de imunoglobulinas necessários para conferir proteção aos bezerros recém-nascidos são diretamente influenciados por fatores ambientais e pela carga de patógenos à qual as matrizes são expostas (HOPKINS et al., 1984). De fato, a concentração de imunoglobulinas no colostro é o fator mais importante a se considerar para avaliar a eficácia da transfêrencia de imunidade passiva. Obviamente, se a concentração sérica de imunoglobulinas nas vacas for baixa, menor será a qualidade do colostro, sendo necessário ingestão de maior volume por parte dos bezerros (QUIGLEY et al., 1995).

O tranferência de anticorpos circulantes para a glândula mamária é uma etapa fundamental para a formação de um colostro de qualidade e, conseqüentemente, para a construção de imunidade passiva dos bezerros (LARSON et al., 1980). Foi observado que embora as vacas tenham apresentado baixa soropositividade para *A. marginale* durante a formação do colostro, a transferencia de IgG foi eficiente, pois os níveis de IgG nas matrizes antes do parto não diferiram estatisticamente ($p > 0.05$) dos níveis dos bezerros após a ingestão do colostro. Baixas concentrações de IgG no colostro são fatores de limitação importantes para o sucesso da transferência passiva de imunidade para bezerros (BESSER et al., 1991). O bezerro bovino nasce em um estado agamaglobulinêmico e depende da transferência passiva de imunoglobulinas do colostro para o início de sua imunidade humoral passiva (PRITCHETT et al., 1991). Bezerros com falha de transferência passiva colostrual de imunoglobulinas estão em maior risco de morbidade e mortalidade por doenças infecciosas (PRITCHETT et al., 1991).

Madruga et al. (1987), monitorando bezerros mestiços da raça Nelore desde o nascimento até os 210 dias de idade, detectaram uma queda de anticorpos colostrais

contra *A. marginale* com idade média de 47 dias, indicando o desaparecimento da imunidade humoral adquirida passivamente ou sua presença em níveis extremamente baixos. Em outro trabalho Madruga et al. (1985), examinando 50 bezerros da raça Nelore, Ibagé e mestiços, relataram que o número de animais sorologicamente negativos aumentou aos 30 dias e atingiu valores máximos aos 60 dias, sugerindo que em torno de 60 dias de idade há uma população de bezerros com risco potencial de contrair a infecção e apresentar sinais clínicos da doença. Nesse trabalho, esse período crítico foi semelhante ao observado por Pacheco et al. (2004), superior aos 120 dias de vida, onde podemos observar o menor número de animais soropositivos em ambas as propriedades.

Neste estudo, observou-se que 80% das bezerras *B. taurus*, assim como as F1 foram soronegativas (4/5) para *A. marginale* mesmo após a ingestão do colostro. Por outro lado, nas bezerras *B. indicus* a soropositividade foi de 80% (4/5) e nas girolandas 60% (2/5) (Figura 20).

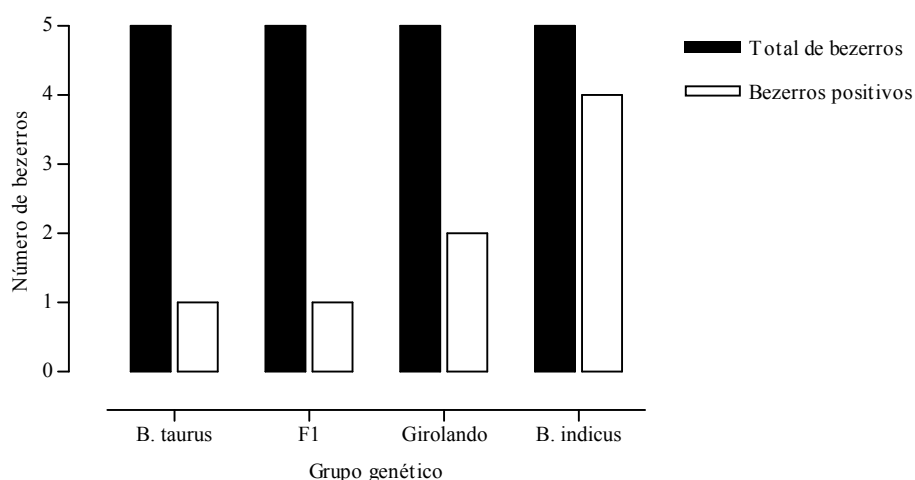


Figura 20. Número de animais soropositivos obtidos através do ensaio imunoenzimático indireto para *Anaplasma marginale* em bezerros após a ingestão do colostro, segundo o grupo genético, Pesagro-Rio, 2008-2010.

Estes resultados refletem a concentração de IgG contra *A. marginale* nas matrizes em função do grupo genético pois, vacas *B. taurus* foram mais susceptíveis, deste modo transferiram menor quantidade de anticorpos através do colostro. A concentração de IgG no colostro de vacas *B. taurus* (Holandesas) ao parto é relativamente baixa quando comparada com as de outras raças, o que exige a ingestão de grande volume de colostro para que os bezerros apresentem uma massa protetora de imunoglobulinas (BESSER et al., 1991).

Em função das concentrações de IgG1 nas secreções lacteas de vacas Holandesas serem normalmente elevadas (BRANDON et al., 1971), baixas concentrações de imunoglobulinas sericas nas vacas no pré-parto pode resultar da diminuição da transferência de IgG em secreções durante os últimos 3 a 10 dias de gestação (SASAKY et al., 1976). A redução na concentração de IgG nas secreções mamárias durante os últimos 3-10 dias de gestação pode ser efeito dos glicocorticóides (BRANDON et al., 1975), inibindo o transporte seletivo de IgG1 em secreções mamárias.

5 CONCLUSÕES

As variáveis padrão racial, estado fisiológico, produção leiteira, número de lactações, idade e taxa de lotação como importantes indicadores de risco epidemiológico para altas infestações por *Rhipicephalus microplus*;

A diferença do grau de infestação dos animais por *Rhipicephalus microplus*, sugere que a forma mais adequada de controle de carrapatos em rebanhos heterogêneos seja a tratamento seletivo com base em estudos epidemiológicos.

As variáveis: padrão racial, estado fisiológico, produção leiteira, número de lactação, idade, densidade animal e infestação por *Rhipicephalus microplus* foram indicadores de risco para a ocorrência de anaplasmose;

A frequência de IgG anti-*Anaplasma marginale* em bezerros recém nascidos e diretamente proporcional aos níveis circulantes de anticorpos nas matrizes quatro semanas antes do parto. Assim, mensuração dos níveis de anticorpos em matrizes no terço final da gestação pode ser uma medida adequada para verificar o estatus imunológico dos bezerros recém nascidos;

Embora localizada em uma região de estabilidade endêmica para *Anaplasma marginale*, a propriedade foi caracterizada como instável. Por esta razão, sugere-se que durante estudos epidemiológicos de anaplasmose, cada fazenda seja considerada como uma "unidade epidemiológica", onde inúmeros fatores de risco possam influenciar diretamente na frequência do agente no rebanho.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A.B.F.; SILVA, R.G.; COSTA, A.J.; ROCHA, U.F.; LANDIM, V.J.C. Genetic and environmental aspects of the resistance of Zebu cattle to the tick *Boophilus microplus*. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 6, 1998, Armidale: NSW, Austrália. **Proceedings**. Armidale, v.27, p.339-342, 1998.

ANON. **Australian code of practice for the care and use of animals for scientific purposes**. Australian Government Publishing Service, Canberra, ACT, Australia, 2002.

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**, Belo Horizonte, v.50, n.3, p.243-246, 1998.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.4, p.139-148, 2003.

AUBRY, P.; GEALE, D. W. A review of bovine anaplasmosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.58, n.1, p.1-30, 2010.

BAYLEY, A. J. **Compendium of veterinary products**. 8º edição. North American Compendiums INC, Port Huron, MI. 2005.

BELTRAN, L.G. Características de lá campaña nacional mexicana contra lá garrapata. In: SEMINÁRIO SOBRE ECTOPARASITAS, 1, 1977, Colombia. **Anais...** Colombia, v.1, p.77-96, 1977.

BERTRAND, J.A.; BERGER, P.J.; FREEMAN, A.E.; KELLEY, D.H. Profitability in daughters of high versus average Holstein sires selected for milk yield of daughters. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.6, p.2287-2294, 1985.

BESSER, T. E.; GAY, C. C.; PRITCHETT, L. Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.198, n.3, p.419-422, 1991.

BESSER, T. E.; GAY, C. C. Colostral transfer of immunoglobulins to the calf. **Ann Veterinary**, v.33, n.1, p.53-61, 1993.

BESSER, T. E.; GAY, C. C. The importance of colostrum to the health of the neonatal calf. **The Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice**, v.10, n.1, P.107-117, 1994.

BOCK RE, DE VOS AJ, KINGSTON TG, MCLELLAN DJ. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Australian Veterinary Journal**, v.75, p.337-340, 1997a.

BOCK, R. E.; KINGSTON, T. G.; DE VOS, A. J. Effect of breed on transmission rate and innate resistance of cattle to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v.77, n.2, p.461-464, 1999c.

BONIZZI, L.; AMADORI, M.; MELEGARI, M.; PONTI, W.; CECCARELLI, A. Characterization of some parameters of non-specific immunity in dairy cattle (I). **Journal of Veterinary Medicine**, v.36, p.365–373, 1989.

BONIZZI, L.; MENANDRO, M. L.; PASOTTO, D.; LAUZI, S. Transition Cow: Non-specific Immune Response. **Veterinary Research Communications**, v.27, Suppl.1, p.137-142, 2003.

BRANDON, M.R.; WATSON, D.L.; LASCELLES, A.K. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 49, n.1, p. 613-623. 1971.

BRANDON, M. R.; HUSBAND, A. J.; LASCELLES, A. K. The effect of glucocorticoid on immunoglobulin secretion into colostrum in cows. **Australian Journal of Experimental Biology e Medical Science**. v.53, n.4, p.43-48, 1975.

BROWN, W.C.; SHKAP, V.; ZHU, D.; MCGUIRE, T.C.; TUO, W.; MCELWAIN, T.F.; PALMER, G.H. CD4+ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. **Infection Immunology**, v. 66, n. 11, p. 5406–5413, 1998a.

BROWN, W.C.; PALMER, G.H.; LEWIN, H.A.; MCGUIRE, T.C. CD4(+) T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. **Infection and Immunity**, v.69, n.11, p.6853–6862, 2001b.

BRUM, J.G.W.; COSTA, P.R.P.; RIBEIRO, P.B.; GONZALES, J.C. Flutuação Sazonal de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) no município de Pelotas, RS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.39, n.6, p.891-896, 1987.

BURTON, J. L.; KENNEDY, B. W.; BURNSIDE, B. N.; WILKE, B. N.; BURTON, J. H. Variation in serum concentrations of immunoglobulins G, A and M in Canadian Holstein-Friesian calves. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.1, p.135-149, 1989.

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.

CHOMEL, B. Tick-borne infections in dogs - An emerging infectious threat. **Veterinary Parasitology**, v.179, n.4, p.294-301, 2011.

CHORFI, Y.; LANEVSCHI-PIETERSMA, A.; GIRARD, V.; TREMBLAY, A. Evaluation of variation in serum globulin concentrations in dairy cattle. **Veterinary Clinical Pathology**, v.33, n.3, 2004.

COETZEE, J.F.; APLEY, M.D.; KOCAN, K.M.; RURANGIRWA, F.R.; VAN DONKERSGOED, J. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. **Veterinary Parasitology**, v.127, n.2, p.61–73, 2005.

COLEMAN, P. G.; PERRY, B. D.; WOOLHOUSE, M. E. J. Endemic stability a veterinary idea applied to human public health. **The Lancet**, v.357, n.9263, p.1284-1286, 2001.

CONSTANTINOIU, C. C.; JACKSON, L. A.; JORGENSEN, W. K.; LEW-TABOR, A. E.; PIPER, E. K.; MAYER, D. G.; VENUS, B.; JONSSON, N. N. Local immune response against larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v.40, n.1, 865-875, 2010.

D'ANDREA, L. A. Z.; SARTOR, I. F.; MADRUGA, C. R.; FREITAS, S. B. Z.; KROLL, L. B.; KRONKA, S. N. Immunological condition of cattle in Holstein and Nelore breed in regard to *Babesia bovis* and *B. bigemina* in two regions of the State of São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.2, p.74-78, 2006.

DARLINGTON, P.B. Anaplasmosis in cattle (Galziete) found to exist in Kansas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.7, n.1, p.39–41, 1926.

DE CASTRO, J. J. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. **Veterinary Parasitology**, v.71, n.2-3, p.77–97, 1997.

DE LA FUENTE, J.; RODRIGUEZ, M.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; GARCÍA GARCÍA, J. C.; MEN-DEZ, L.; SERRANO, E.; VALDÉS, M.; ENRIQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUÉ, O.; MACHADO, H.; LLEONART, R.; DE ARMAS, C. A.; REY, S.; RODRÍGUEZ, J. L.; ARTELES, M.; GARCÍA, L. Field studies and cost effectiveness analysis of vaccination with Gavac™ against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v.16, n.4, p.366–373, 1998.

DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; MCEWEN, B.R.; CLAWSON, D.; KOCAN, K.M. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. **International Journal for Parasitology**, v.31, n.14, p.1705–1714, 2001a.

DE LA FUENTE, J.; NARANJO, V.; RUIZ-FONS, F.; VICENTE, J.; ESTRADA-PENÁ, 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.; VICENTE, J.; HÖFLE, U.; RUIZ-FONS, F.; FERNÁNDEZ DE MERA, I.G.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; KOCAN, K.M.; GORTÁZAR, C. *Anaplasma marginale* infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla La Mancha, Spain. **Veterinary Microbiology**, v.100, n.3-4, p.163–173, 2004a.

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, 2005b.

DETILLEUX, J.C.; KEHRLI, JR. M.E.; STABEL, J.R.; FREEMAD, A.E.; KELLEY, D.H. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.44, n.1, p.251-267, 1995.

DIXON, R. L.; HART, L. G.; FOUTS, J. R. The metabolism of drugs by liver microsomes from alloxan-diabetic rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.133, n.1, p.7-11, 1961.

DOUBE; WHARTON, The effect of locality, breed and previous tick experience on seasonal changes in the resistance of cattle to *Boophilus microplus* (Ixodoidea: Ixodidae). **Cellular and Molecular life science**, v.36, n.10, p.1178-1179, 1980.

DRACKLEY, J. K. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? **Journal of Dairy Science**. v.82, n.11, p.2259-2273, 1999.

DREHER, U. M.; DE LA FUENTE, J.; HOFMANN-LEHMANN, R.; MELI, M. L.; PUSTERLA, N.; KOCAN, K. M.; WOLDEHIWET, Z.; BRAUN, U.; REGULA, G.; STAERK, K. D.; LUTZ, H. Serologic cross-reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, n.10, p.1177–1183, 2005.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “EGH agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.1, p.2145- 2165, 2001.

ELFSTRAND, L.; LINDMARK-MÅNSSON, H.; PAULSSON, M.; NYBERG, L.; ÅKESSON, B. Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. **International Dairy Journal**, v.12, n.11, p.879-887, 2002.

EMANUELSON, U.; DANELL, B.; PHILLIPSSON, J. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts, and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood. **Journal of dairy science**, v.71, n.1, p.467-475, 1988.

EMA, 2005. **Note for guidance on environmental risk assessment of medicinal products for human use**. CPMP/SWP/4447/00 draft corr., European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London. Disponível em: <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/444700en.pdf>. Acessado em: Julho 2011.

ENEVOLDSEN, C.; DEWHURST, R.J.; FRIGGENS, N.C. On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. **Livestock Production Science**, v.83, n.2-3, p. 277–308, 2003.

ERIKS, I. S.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; ALLRED, D. R.; BARBET, A. F. Detection and qualification of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.2, p.279-284, 1989.

ERIKS, I. S.; STILLER, D.; PALMER, G. H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. **Journal of clinical microbiology**, v.31, n.8, 2091-2096, 1993.

ESTES, D. M.; CLOSSER, N. M.; ALLEN, G. K. IFN- γ stimulates IgG₂ production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. **Cell Immunology**, v.154, n.2, p.287-295, 1994.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the tick (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.4, p.453-470, 2000.

EWING, S.A. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: Hidalgo, R.J., Jones, E.W. (Eds.), Proc. 7^o Nat. Anaplasmosis Conf., Mississippi State University, MS, p.395–423, 1981.

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.29, n.849, p.1–10, 1998.

FLECHTMANN, C.A.W. **Ácaros de importância medicoveterinária**. 3.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 192 p.

FRAGA, A. B.; ALENCAR, M. M.; FIGUEIREDO, L. A.; RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J. N. S. G. et al. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*), **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1578-1586, 2003.

FRAGA, A. B.; ALENCAR, M. M.; FIGUEIREDO, L. A., RAZOOK, A. G.; CYRILLO, J. N. S. G. Genetics analysis of the infestation of females of Caracu cattle breed by Horn

Fly (*Haematobia irritans*) (L) (diptera, Muscidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.2, p.242-247, 2005.

FRANCIS J. Resistance of zebu and other cattle to tick infestation and babesiosis with special reference to Australia: an historical review. **Veterinary Journal B**, v.122, n.1, p.301-307, 1966.

FRISCH, J. E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **International Journal for Parasitology**. v.29, n.2, p.57-71, 1999.

FURLONG, J.; DERESZ, F.; MATOS, L. L.; WENDLING, T. J.; GONÇALVES, D. M. H. R. The effect of cattle tick *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) infestation on milk yield and feed intake of holstein x zebu crossbred cows. IN: XV CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 1996, campo grande. Anais... Campo Grande, 1996. p.340.

GALE, K. R.; LEATCH, G.; DE VOS, A. J.; JORGENSEN, W. K. *Anaplasma marginale*: effect of challenge of cattle with varying doses of infected erythrocytes. **International Journal Parasitology**, v.26, n.12, p.1417-1426, 1996.

GE, N.L.; KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F.; MURPHY, G.L. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adult using nonradioactive in situ hybridization. **Journal of Medical Entomology**, v.33, n.6, p.911-920, 1996.

GONZALES, J. C. O. **Controle do Carrapato dos Bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 103p, 1975.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.125, n.1, p.8-10, 2002.

GUARAGNA, G.P.; CARVALHO, J.B.P.; FIGUEIREDO, GAMBI, I.; B.; MARBOSA, M. I. A. Efeito de fatores genéticos e ambientais na infestação natural de carrapato (*Boophilus microplus*, CANESTRINI) em bovinos leiteiros. **Boletim de Indústria Animal**, v.45, n.1, p.19-32, 1988.

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

GUY, M. A.; MCFADDEN, T. B.; COCKRELL, D. C.; BESSER, T. E. Regulation of Colostrum Formation in Beef and Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**. v.77, n.10, p.3002-3007, 1994.

HENRIOUD, A. N. Towards sustainable parasite control practices in livestock production with emphasis in Latin America. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.1-2, p.2-11, 2011

HEUER, C.; SCHUKKEN, Y.H.; DOBBELAAR, P. Postpartum body condition score and results from the first test day milk as predictors of disease, fertility, yield, and culling in commercial dairy herds. **Journal Dairy Science**, v.82, n.2, p.295–304, 1999.

HEWETSON, R. W. Resistance by cattle to the cattle tick *Boophilus microplus*. III. The development of resistance to experimental infestations by purebred Sahiwal and Australian Illawarra shorthorn cattle. **Australian Journal Agricultural Research**. v.22, n.1, p.331–342, 1971.

HOPKINS, F. M.; DEAN, D. F.; GREENE, W. Failure of passive transfer in calves: comparison of field diagnosis methods. **Modern Veterinary Practice**, v.65, n.8, p.625-628, 1984.

INGVARTSEN, K. L.; DEWHURST, R. J.; FRIGGENS, N. C. On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. **Livestock Production Science**, v.83, n.2-3, p.277–308, 2003.

JOHNSTON, L.A.Y.; HAYDOCK, K.P. The effect of cattle tick (*Boophilus microplus*) on production of Brahman-cross and British-breed cattle in Northern Australia. **Australian journal Veterinary**, v.45, n.4, 175-179, 1969.

JONES, E.W.; KLIEWER, I.O.; NORMAN, B.B.; BROCK, W.E. *Anaplasma marginale* infection in young and aged cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.29, n.3, p.535–544, 1968.

JONSSON, N. N.; MAYER, D. G.; MATSCHOSS, A. L.; GREEN, P. E.; ANSELL, J. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v.78, n.2-3, p.65-77, 1998.

JONSSON, N. N.; MATSCHOSS, A. L.; PEPPER, P.; GREEN, P. E.; ANSELL, J. Resistance of Holstein–Friesian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Veterinary Parasitology**, v.89, n.1, p.297–305, 2000.

JONSSON, N.N.; REID, S.W.J. Global climate change and vector borne diseases. Guest editorial. **The Veterinary Journal**, v.160, n.2, p.87–89, 2000.

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

JONSSON, N. N.; BOCK, R. E.; JORGENSEN, W. K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. **Veterinary Parasitology**, v.155, n.2, p.1-9, 2008.

KEHRLI, M. E.; NONNECKE, B. J.; ROTH, J. A. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. **American Journal of Veterinary Research**. v.50, n.2, p.215–220, 1989a.

KEHRLI, M.E.; NONNECKE, B.J.; ROTH, J.A. Alterations in bovine neutrophils function during the periparturient period. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, n.2, p.207–214, 1989b.

KEHRLI, M. E. JR.; WEIGEL, K. A.; FREEMAN, A. E.; THURSTON, J. R. KELLEY, D. H. Bovine sire effects on daughters' in vitro blood neutrophil functions, lymphocyte blastogenesis, serum complement and conglutinin levels. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.27, n.4, p.303-319, 1991b.

KEMP, D. H.; BOURNE, A. *Boophilus microplus*: the effect of histamine on the attachment of cattle-tick larvae—studies in vivo and in vitro. **Parasitology**, v.80, n.3, p.487-496, 1980.

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.

KITCHENHAM, B. A.; ROWLANDS, G. J.; SHORBAGI, H. Relationships of concentrations of certain blood constituents with milk yield and age of cows in dairy herds. **Research Veterinary Science**, v.18, n.3, p.249–252, 1975.

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

KOCAN, K.M. Development of *Anaplasma marginale* in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. In: Sauer, J.R., Hair, J.A. (Eds.), **Morphology, Physiology and Behavioral Ecology of Ticks**. Ellis Horwood Ltd., England, p. 472–505, 1986.

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.5, n.4, p.499–507, 1992b.

KOCAN, K. M.; FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELENDEZ, R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n.1, 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, Supl.1, p.285–300, 2004a.

KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; 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.

KUTTLER, K.L.; TODOROVIC, R.A. Techniques of premunization for the control of Anaplasmosis. In: Jones, E.W. (Ed.), **Proceedings of the 6° National Anaplasmosis Conference**, Las Vegas, NV, p.106–112, 1973.

LARSON, B.L.; KENDALL, K.A. Changes in specific blood serum protein levels associated with parturition in the bovine. **Journal of Dairy Science**, v.40, n.1, p.659-666, 1957.

LARSON, B.L.; HAYS, R.L. An explanation for bovine parturition edema and treatment with blood protein replacements. **Journal of Dairy Science**, v.41, n.1, p.995-997, 1958.

LARSON, B.L.; HEARY JR., H.L.; DEVERY, J.E. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v.40, n.1, p.377-380, 1980.

LEWIS, I. J. Observations on the dispersal of larvae of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Bulletin of Entomological Research**, v.59, n.4, p.595-604, 1968.

LIBERG P. Agarose gel electrophoretic fractionation of serum proteins in adult cattle. 1. A study of clinically healthy cows. **Acta veterinary scandinavia**. v.18, n.1, p.40–53, 1977.

LIMA, W. S.; RIBEIRO, M. F; GUIMARÃES, M. P. Seasonal variation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in cattle in Minas Gerais State, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 32, n.6, p.375-380, 2000.

MACHADO, R.Z.; MONTASSIER, H.J.; PINTO, A.A.; LEMOS, E.G.; MACHADO, M.R.F.; VALADÃO, I.F.F.; BARCI, L.G.; MALHEIROS, E.B. An enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v.71, n.1, p.17-26, 1997.

MACHADO NETO, R.; D'ARCE, R.D. Proteínas séricas nos períodos pré e pós-parto de vacas da raça Nelore. **Revista de Agricultura**, v.53, n.1, p.13-19, 1979.

MADOFF, L. C. The Program for Monitoring Emerging Diseases, a program of the International Society for Infectious Diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v.39, n.2, p.227-232, 2004.

MADRUGA, C. R.; KESSLER, R. H.; GOMES, A.; SCHENK, M. A. M.; ANDRADE, D. F. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça nelore, ibagé e cruzamentos de nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, n.1, p.135-142, 1985.

MADRUGA, C. R.; HORNER, M. R.; SCHENK, M. A. M.; CURVO, J. B. E. Avaliação preliminar de parâmetros epidemiológicos da Tristeza Parasitária Bovina no Mato Grosso do Sul. Campo Grande: Embrapa/CNPGC, 1987. (Boletim de pesquisa, n.38).

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

MAGONA, J. W.; WALUBENGO, J.; OLAHO-MUKANI, W.; JONSSON, N. N.; WELBURN, S. C.; EISLER, M. C. Clinical features associated with seroconversion to *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *Theileria parva* infections in African cattle under natural tick challenge. **Veterinary Parasitology**, v.155, n.1-2, p.273–280, 2008.

MALLARD B.A.; DEKKERS J.C.; IRELAND M.J.; LESLIE, K.E.; SHARIF, S.; VANKAMPEN, C.L.; WAGTER, L.; WILKIE, B.N. Alteration in Immune responsiveness during the peripartum period and its Ramification on dairy cow and calf health. **Journal dairy Science**, v.81, N.2, p.585–595, 1998a.

MALOO, S. H.; ROWLANDS, G. J.; THORPE, W.; GETTINBY, G.; PERRY, B. D. A longitudinal study of disease incidence and case-fatality risks on small-holder dairy farms in coastal Kenya. **Preventive Veterinary Medicine**, v.52, n.1, p.17–29, 2001.

MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A.; NASCIMENTO, C.S.; SILVA, M.V.G.B.; TEODORO, R.L.; FURLONG, J.; PRATA, M.C.A.; CAMPOS, A.L.; GUIMARÃES, M.F.M.; AZEVEDO, A.L.S.; PIRES, M.F.A.; VERNEQUE, R.S. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. **Genetics and Molecular Research**, v.5, n.3, p.513-524., 2006.

MCGUIRE T.C.; MUSOKE A.J.; KURTTI T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. **Immunology** v.38, n.1, p.249-256, 1979.

MELO, V. S. P.; PASSOS, L. M. F.; FACURY-FILHO, E. J.; SATURNINO, H. M.; RIBEIRO, M. F. B. Natural infection off calves by *Anaplasma marginle* in dairy Herds off the Metalúrgica Region, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.4, p.146-150, 2001.

MORAES, M. P.; WEIBLEN, R.; SILVA, A. M. & TOBIAS, F. L. Evolução da imunidade passiva em fêmeas bovinas da raça holandesa. **Ciências Rural**. v.27, n.3, p.435-440, 1997.

MORAES, F.R.; MORAES, J. R. E.; COSTA, A. J.; ROCHA, U. F.; WOELZ, C.R. Ecologia de carrapatos. XV: Suscetibilidade natural comparativa entre taurinos e zebuínos a *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari, Ixodidae). **Arquivo Veterinária**, v.2, n.1, p.45-52, 1986.

MORZARIA, E.P.; KATENDE, J.; MUSOKE, A.; NENE, V.; SKILTON, T.; BISHOP, R. Development of sero-diagnostic and molecular tools for the control on important tick-borne pathogens of cattle in Africa. **Parasitology** v.41, Suppl.1, p.73–80, 1999.

MUNODZANA, D.; MCELWAIN, T.F.; KNOWLES, D.P.; PALMER, G.H. Conformational dependence of *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface-exposed B-cell epitopes. **Infection and Immunity**, v.66, n.6, p.2619–2624, 1998.

MURRELL, A.; CAMPBELL, N. J. H.; BARKER, S.C. A total evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.21, n.2, p.244–58, 2001b.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) (2003). **Systematic Parasitology**, v.56, n.3, p.169-172, 2003.

NUÑES, J. L.; MUÑOZ COBENAS, M. E.; MOLTEDO, H. L. **Boophilus microplus, la garrapata comum del ganado vacuno**. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1982. 19 p.

OGDEN, N. H.; SWAI, E.; BEAUCHAMP, G.; KARIMURIBO, E.; FITZPATRICK, J. L.; BRYANT, M. J.; KAMBARAGE, D.; FRENCH, N. P. Risk factors for tick attachment to smallholder dairy cattle in Tanzania. **Preventive Veterinary Medicine**, v.67, n.2-3, p.157–170, 2005.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. I. Infestação artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.22, n.4, p.433-438, 1987.

OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M.; FREITAS, A. R. Resistência de bovinos ao carrapato *Boophilus microplus*. II. Infestação natural. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.24, n.10, p.1267-1271, 1989.

OLIVEIRA, A. A.; DE PEDREIRA, P. A. S.; ALMEIDA, M. F. R. Doenças de bezerro. II Epidemiologia da anaplasmosse no estado de Sergipe. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, n.2, p.377-386, 1992.

OPDEBEECK, J. P.; WONG, J. Y. M.; JACKSON, L. A.; DOBSON, C. Hereford cattle immunized and protected against *Boophilus microplus* with soluble and membrane-associated antigens from the midgut of ticks. **Parasite Immunology**, v.10, n.4, p.405-410, 1988.

OTIM, C.; WILSON, A.J.; CAMPBELL, R.S.F. A comparative study of experimental anaplasmosis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.56, n.6, p.262–266, 1980.

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

PALMER, G.H. Anaplasma vaccines. In: Wright, I.G. (Ed.), **Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines**. p.1–29, 1989.

PALMER, G.H.; RURANGIRWA, F.R.; KOCAN, K.M.; BROWN, W.C. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Parasitology Today**, v.15, n.1, p.253–300, 1999.

PALMER, G. H.; W. C. BROWN, W. C.; RURANGIRWA, F. R. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. **Microbes and Infection**, v.2, n.1, p.167–176, 2000.

PARKER, R. J.; SHEPHERD, R. K.; TRUEMAN, K. F. Susceptibility of *Bos indicus* and *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. **Veterinary Parasitology**, v.17, n.1, p.205-213, 1985.

PATARROYO, J. H.; VARGAS, M. I.; GONZÁLEZ, C. Z.; GUZMÁN, F.; MARTINS-FILHO, O. A.; AFONSO, L. C. C.; VALENTE, F. L.; PECONICK, A. P.; MARCIANO, A. P.; PATARROYO, V. A. M.; SOSSAI, S. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm74621 against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.166, n.3-4, p.333–339, 2009.

PAYNE, R. C.; OSORIO, O. Tick-borne diseases of cattle in Paraguai. I. Seroepidemiological studies on anaplasmosis and babesiosis. **Tropical Animal Health and Production**, v.22, n.1, p.53-60, 1990.

PEGRAM ET, R. G.; JAMES, A. D.; OOSTERWIJK, G. P. M.; KILLORN, K. J.; LEMCHE, J.; GHIROTTI, M.; TEKLE, Z.; CHIZYUKA, H. G. B.; MWASE, E.T.; CHIZHUKA, F. Studies on the economics of tick in zambia. **Experiments and Applied Acarology**, v.12, n.1-2, p.9-26, 1991.

PÉREZ, E.; LEROY, E.; CARRILLO, J. M. Anaplasmosis y piroplasmosis: estudio epidemiológico en la estación experimental, Los Diamantes. **Ciencias Veterinarias**, v.2, n.1 , p.7-20, 1980.

PEREZ, E.; HERRERO, M. V.; JIMENEZ, C.; HIRD, D.; BUENING, G. B. Effect of management and host factors on seroprevalence of bovine anaplasmosis and babesiosis in Costa Rica. **Preventive Veterinary Medicine**, v.20, n.1-2, p.33-46, 1994a.

PEREZ, E.; HERRERO, M. V.; JIMENEZ, C.; CARPENTER, T. E.; BUENING, G. B. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Costa Rica. **Preventive Veterinary Medicine**, v.20, n.1-2, p.23-31, 1994b.

PIPER, E.K.; JONSSON, N.N.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A.E.; MOOLHUIJZEN, P.; VANCE, M.E.; JACKSON, L.A. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, n.4, p.1074–1086, 2009.

PIPER, E.K.; JACKSON, L.A.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A.E.; JONSSON, N.N. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v.40, n.4, p.431–441, 2010.

POTGIETER, F.T.; STOLTSZ, W.H. Anaplasmosis. In: Coetzer, J.A.W., Thompson, G.R., Tustin, R.C. (Eds.), **Infectious Diseases of Livestock- With Special Reference to Southern Africa**. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, 1994, p.408–430.

PRITCHETT, L. C.; GAY, C. C.; BESSER, T. E.; HANCOCK, D. D. Management and production factors influencing immunoglobulin G₁ concentration in colostrum from Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.7, p.2336-2341, 1991.

PRUETT, J.H.; OLAFSON, P.U.; DAVEY, R.B. Serologically defined *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larval antigens in BmLF3, a partially pure Sphacryl S-300 fraction of crude larval proteins. **Veterinary Parasitology**, v.155, n.2-3, p.264–272, 2008.

QUIGLEY, J. D.; MARTIN, K. R.; BEMIS, D. A.; POTGIETER, L. N. D.; REINEMEYER, C. R.; ROHRBACH, B. W.; DOWLEN, H. H.; LAMAR, K. C. Effects of housing and colostrum feeding on serum immunoglobulins, growth, and fecal scores of jersey calves. **Journal of Dairy Science**, v.78, n.4, p.893-901, 1995.

RAND, K. N.; MOORE, T.; SRISKANTHA, A.; SPRING, K.; TELLAM, R.; WILLADSEN, P.; COBON, G. S. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Proceeding of the National Academy of Science**. v.86, n.24, p.9657–9661, 1989.

RIBEIRO, M. F. B.; REIS, R. Prevalência da Anaplasmosse em quatro regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v.33, n.1, p.57-62, 1981a.

RIBEIRO, M. F. B.; PATARROYO, J. H. S.; SANTOS, J. L.; FARIA, J. E. Epidemiologia da anaplasmosse bovina no estado de Minas Gerais. I – Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v.36, n.4, p.425-432, 1984.

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.1-2, p.31-39, 1996.

RIBEIRO, M. F. B.; FACURI FILHO, E. J.; PASSOS, L. M. F.; SATURNINO, H. M.; MALACCO, M. A. Uso de inóculo padronizado de *Anaplasma marginale* e da quimioprofilaxia no controle da anaplasmosse bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.1, p.21-26, 2003.

RIKIHISA, Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nature*, v.8, n.2, p. 328-339, 2010.

RISTIC, M. Anaplasmosis. **Advances in Veterinary Science**, v.7, n.1, p.111-192, 1960.

RISTIC, M. Bovine anaplasmosis. In: Kreier, J. **Parasitic Protozoa**. (Ed.), v.4. Academic Press, New York, 1977, p.235–249.

ROCHE, J.F.; MACKEY, D.; DISKIN, M.D. Reproductive management of postpartum cows. **Animal Reproduction Science**, v.2, n.60–61, p.703–712, 2000.

RODRÍGUEZ, C. S. D.; GARCÍA, O. M. A.; CANTÓ, A. G. J.; HERNÁNDEZ, S. G.; SANTOS, C. N.; ABORTES, T. R. Ensayo de un inmunógeno experimental inactivado contra *Anaplasma marginale*. **Técnica Pecuaria en México**, v.37, n.1, p.1–12, 1999.

RODRÍGUEZ, S. D.; ORTIZ, M. A. G.; OCAMPO, R. J.; MURGUÍA, C. A. V. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, n.1, p.1092–1101, 2009.

ROY, J.H.B. The calf - **Management of health**. 5. ed. London: Butterworths, 1990. Cap. 2: Immunity to disease: p. 17-52.

RURANGIRWA, F.R.; STILLER, D.; FRENCH, D.M.; PALMER, G.H. Restriction of major surface protein 2 (MSP2) variants during tick transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, n.2, p.3171–3176, 1999.

SAMISH, M.; GINDIN, G.; ALEKSEEV, E.; GLAZER, I. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Journal Parasitology**, v.38, n.6, p.1355-1359, 2001.

SASAKI, M.; DAVIS, C.L.; LARSON, B.L. Production and turnover of IgG1 and IgG2 immunoglobulins in the bovine around parturition. **Journal Dairy Science**, v.59, n.12, p.2046-2055, 1976.

SCHLEGER, A. V.; LINCOLN, D. T.; MCKENNA, R. V.; KEMP, D. H.; ROBERTS, J. A. *Boophilus microplus*: cellular responses to larval attachment and their relationship to host resistance. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.29, n.1, p.499-512, 1976.

SCOLES, G.A.; BROCE, A.B.; LYSYK, T.J.; PALMER, G.H. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v.42, n.4, p.668–675, 2005a.

SEIFERT, G.W. Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infestations of the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Australian Journal Agricultural Research**, v.22, p.159–168, 1971.

SHAFER-WEAVER, K.A.; PIGHETTI, G.M.; SORDILLO, L.M. Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.212, n.3, p.271–280, 1996.

SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, v.17, n.2, p.74–80, 2001.

SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.7, p.1477-1482, 2010.

SMITH, R.D.; HUNGERFORD, L.L.; ARMSTRONG, C.T. Epidemiologic investigation and control of an epizootic of anaplasmosis in cattle in winter. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.195, n.3, p.476-480, 1989.

SNOWBALL, G. J. Ecological observation on the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v.8, n.4, p.394-413, 1957.

SOLBU, H. Disease recording in Norwegian dairy cattle. I. Disease incidences and non-genetic effects on mastitis, ketosis and milk fever. **Zeitschrift fur Tierzucht und Zuchtungsbiologie**, v.100, n.2, p.139-157, 1983.

SONENSHINE, D. E.; KOCAN, K. M.; DE LA Fuente, J. Tick control: further thoughts on a research agenda. **Trends in Parasitology**, v.22, n.12, p.550-551, 2006.

SOSSAI, S.; PECONICK, A. P.; SALES-JUNIOR, P. A.; MARCELINO, F. C.; VARGAS, M. I.; NEVES, E. S.; PATARROYO, J. H. Polymorphism of the *bm86* gene in South American strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v.37, n.3-4, p.199-214, 2005.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; 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, 2000.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; MADRUGA, C. R.; MASSARD, C. L. Prevalência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do médio paraíba. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.309-314, 2001.

SUAREZ, C. E.; NOH, E. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.2-3, p.109-125, 2011.

SUTHERST, R. W.; KERR, J. D.; MAYWALD, G. F.; STEGEMAN, D. A. The effect of season and nutrition on the resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus*. **Journal of Agricultural Research**, v.34, n.1, p.329-339, 1983.

SWAI, E.S.; KARIMURIBO, E.D.; OGDEN, N.H.; FRENCH, N.P.; FITZPATRICK, J.L.; BRYANT, M.J.; KAMBARAGE, D.M. Seroprevalence estimation and risk factors for *A. marginale* on smallholder dairy farms in Tanzania. **Tropical Animal Health Production**, v.37, p.599-610, 2005.

TEMBUE, A. A. M.; SILVA, J. B.; SILVA, F. J. M.; PIRES, M. S.; BALDANI, C. D.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. F. Seroprevalence of IgG antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle from south Mozambique. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.4, p.1-7, 2011.

TATCHELL, R.; MOORHOUSE, D. The feeding processes of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Parasitology**, v.58, n.1, p.441–459, 1968.

TEODORO, R.L.; LEMOS, A.M.; MADALENA, F.E. Carga Parasitária de *Boophilus microplus* em vacas mestiças europeu x zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.23, n.2, p.223-228, 1994.

TEODORO, R. L.; LEMOS, A. M.; MADALENA, F. E.; MATOS, A. Efeito da infestação de carrapatos sobre a produção de leite em vacas holandesas puras por cruza e mestiças holandes x zebu. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária** (UFMG), Belo Horizonte, v. 25, n.2, p. 47-52, 1998.

THEILER, A. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. **In: 1° Report of the Director of Veterinary Research**. Department of Agriculture of the Union of South Africa, p.7–46, 1911.

TUO W.; PALMER G.H.; MCGUIRE T.C.; ZHU D.; BROWN W.C. Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Infection And Immunity**, v.68, n.1, p.270-280, 2002.

TURTON, J.A.; KATSANDE, T.C.; MATINGO, M.B.; JORGENSEN, W.K.; USHEWOKUNZE-OBATOLU, U.; DALGLIESH, R.J. Observations on the use of *Anaplasma centrale* for immunisation of cattle against anaplasmosis in Zimbabwe. **Journal of Veterinary Research**, v.65, n.2, p.81–86, 1999.

UTECH, K.B.W.; SEIFERT, G.W.; WHARTON, R.H. Breeding Australian Illawarra Shorthorn cattle for resistance to *Boophilus microplus*. 1. Factors affecting resistance. **Australian Journal Agricultural Research**, v.29, p.411-422, 1978a.

VANKAMPEN, C.; MALLARD, B.A. Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.59, n.1–2, p.79–91, 1997.

VALDEZ, R.A.; MCGUIRE, T.C.; BROWN, W.C.; DAVIS, W.C.; JORDAN, J.M.; KNOWLES, D.P. Selective in vivo depletion of CD4+ T lymphocytes with anti-CD4 monoclonal antibody during acute infection of calves with *Anaplasma marginale*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n.2, p.417–424, 2002.

VIDOTTO, O.; BARBOSA, C.S.; ANDRADE, G.M.; MACHADO, R.Z.; DA ROCHA, M.A.; SILVA, S.S. Evaluation of a frozen trivalent attenuated vaccine against Babesiosis and anaplasmosis in Brazil. **Annals of Academic of Science fo New York**, v.849, n.1, p.420-423, 1998.

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.

WAGTER, L. C.; MALLARD, B. A.; WILKIE, B. N.; LESLIE, K. E.; BOETTCHER, P. J.; DEKKERS, J. C. M. The relationship between milk production and antibody response to ovalbumin during the peripartum period. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.3, p.169–173, 2003.

WETTEMANN, R.P. Postpartum endocrine function of cattle, sheep and swine. **Journal of Animal Science**, v.51, n.2, p.2–15, 1980.

WHARTON, R.H.; UTECH, K.B.W.; TURNER, H.G. Resistance to cattle tick, *Boophilus microplus* in a herd of Australian Illawarra Shorthorn Cattle – its assessment and heritability. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.21, n.1, p.163–180, 1970.

WILSON, A.J.; PARKER, R.J.; TRUEMAN, K.F. Anaplasmosis in *Bos indicus* type cattle. In: JOHNSTON, L.A.Y., COOPER, M.G. (Eds.), Proceedings of a Symposium held at the 56th Annual Conference of the Australian Veterinary Association, Townsville, p.26–27, 1980a.

WILSON, A.J.; PARKER, R.; TRUEMAN, K.F. Susceptibility of *Bos indicus* crossbred and *Bos taurus* cattle to *Anaplasma marginale* infection. **Tropical Animal Health Production**, v.12, n.2, p.90–94, 1980b.

WILLADESEN, P.; JONGEJAN, F. Immunology of the tickhost interaction and the control of tick-borne diseases. **Parasitology Today**, v.15, n.7, p.258-562, 1999.

WILLADSEN, P. Tick control: thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, v.138, n.1, p.161-168, 2006.

WTNGER, K.; GAY, C.C.; BESSER, T.E. immunoglobulin GI transfer into induced mammary secretions: the effect of dexametasone. **Journal Dairy Science**, v.78, n.6, p.1306-1309, 1995.

7 ANEXOS

A – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática anti-*Anaplasma marginale*

1. Sensibilizar a placa (Nunc surface) com o antígeno na concentração ótima de 12 µg/mL, diluindo-o em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. Colocar 100 µL/pocinho, exceto no branco da placa;
2. Incubar as placas sensibilizadas por 12 horas em câmara úmida (4°C – geladeira);
3. Lavar as placas 3 vezes com PBS Tween 20. Secar bem as placas após a lavagem;
4. Bloquear com solução PBS Tween 20 + 6% de leite em pó (Molico), colocando 200 µL/pocinho;
5. Incubar as placas em câmara úmida, a 37°C, durante 1 hora e 30 minutos;
6. Lavar as placas 3 vezes com PBS Tween 20. Secar bem as placas após a lavagem;
7. Diluir os soros em PBS Tween 20 + 5% de soro normal de coelho (ou leite em pó Molico), na diluição de 1:400. Colocar 100 µL/pocinho;
8. Incubar as placas em câmara úmida, a 37°C, por 1 hora e 30 minutos;
9. Lavar as placas 3 vezes com PBS Tween 20. Secar bem a placa.
10. Adicionar o conjugado anti-bovino diluído em PBS Tween 20 + 5% de soro normal de coelho, colocando 100 µL/pocinho. Conjugado Sigma diluição 1:30.000 (anti-bovino IgG alkaline phosphatase conjugate). *diluição conforme recomendação do fabricante
11. Incubar as placas em câmara úmida, a 37°C, por 1 hora e 30 minutos;
12. Lavar as placas 3 vezes com PBS Tween 20. Secar bem a placa;
13. Adicionar o substrato para fosfatase alcalina, o paranitrofenilfosfato (pNPP), colocando 100 µL/pocinho. Diluir 2 comprimidos do substrato (5mg cada comprimido) em 10 mL de tampão dietanolamina pH 9,8. Usar frasco escuro ou enrolar em papel alumínio. Cuidado ao usar a multicanal, pois poderá faltar substrato nos últimos pocinhos;
14. Incubar a placa e esperar a reação por 30 minutos à temperatura ambiente;
15. Fazer leitura da placa com filtro de 405 nm.

B - Soluções utilizadas no ELISA

PBS TWEEN 20 ou 80 pH 7,4 – 0,01M

Preparar as 3 soluções-mãe separadamente (1 L cada): Na_2HPO_4 (0,2M), NaH_2PO_4 (0,2M) e NaCl (1,4M).

Solução-mãe		Solução-uso (PBS Tween 20 ou 80)	
		1X	2X
Na_2HPO_4 (0,2M)	28,39 g (anidro)		
ou	ou	40,5 mL	81 mL
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	53,61g		
NaH_2PO_4 (0,2M)	27,6 g	4,4, mL	8,8 mL
NaCl (1,4M)	81,82 g	100 mL	200 mL
	1 L	1 L	2 L

Antes de completar o volume para 1 L da solução-uso, adicionar 0,5 mL de Tween 20 ou 80 e verificar o pH.

Tampão dietanolamina (pH 9,8)

*Dietanolamina (usar luvas).....	20 mL
* MgCl_2 anidro ou.....	0,02 g
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,04 g
*água destilada.....	200 mL

Acertar o pH com HCl 5N e colocar 0,2 mL de azida sódica (NaN_3) 10%.

Tampão Carbonato-Bicarbonato de sódio (pH 9,6), válido por 1 mês

Na_2CO_3	0,3975 g
NaHCO_3	0,7325 g
NaN_3 10%.....	0,5 mL
Água destilada.....	250 mL

Acertar o pH com ácido cítrico 1N.