

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

TESE

**Hemoparasitos Transmitidos por Carrapatos e a Percepção dos Criadores
sobre sua Importância para Bovinos na Região Sul de Moçambique**

ANTÓNIO AMÉLIA DOS SANTOS MUCALANE TEMBUE

2012



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

**HEMOPARASITOS TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS E A
PERCEPÇÃO DOS CRIADORES SOBRE SUA IMPORTÂNCIA PARA
BOVINOS NA REGIÃO SUL DE MOÇAMBIQUE**

ANTÓNIO AMÉLIA DOS SANTOS MUCALANE TEMBUE

Sob a orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

e

Co-orientação
Cleber Oliveira Soares

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, Área de Concentração em
Sanidade Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2012

636.209679

T278h

T

Tembue, Antonio Amélia dos Santos Mucalane,
1962-

Hemoparasitos transmitidos por carrapatos e a percepção dos criadores sobre sua importância para bovinos na região sul de Moçambique / Antonio Amélia dos Santos Mucalane Tembue – 2012.

198 f. : il.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.

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

Bibliografia: f. 122-156.


1. Bovino – Infecções - Moçambique - Teses. 2. Babesiose em bovino – Teses. 3. Carrapato como transmissor de doenças - Teses. I. Fonseca, Adivaldo Henrique da, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

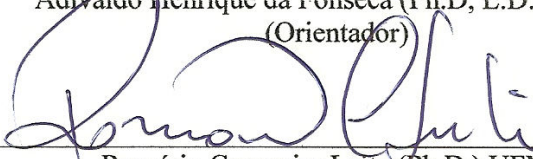
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

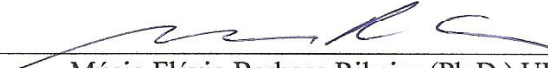
ANTÔNIO AMÉLIA DOS SANTOS MUCALANE TEMBUE

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

TESE APROVADA EM 16 / 02 / 2012



Adivaldo Henrique da Fonseca (Ph.D, L.D.) UFRRJ
(Orientador)


Romário Cerqueira Leite (Ph.D.) UFMG


Múcio Flávio Barbosa Ribeiro (Ph.D.) UFMG


Carlos Luiz Massard (Ph.D.) UFRRJ


Carlos Wilson Gomes Lopes (Ph.D., LD.) UFRRJ


Cleber de Oliveira Soares (Ph.D) Embrapa - CNPGC

Com amor, carinho e respeito à memória dos meus pais, a minha família, pela compreensão necessária para que a distância fosse apenas um pequeno detalhe diante da imensidão do amor, carinho e a ligação que existe entre nós, pelo sacrifício consentido, pela paciência imensurável nos momentos mais difíceis da minha longa ausência a busca de sonhos de infância e o incentivo restaurador que sempre recebi nos momentos mais dramáticos desta grande epopéia.

Dedico

Ontem, enquanto muitos incentivaram, poucos não acreditaram.
No presente, enquanto muitos compartilham esta vitória e
desejam sucessos e felicidades, poucos se lamentam, e exclama!
Ele conseguiu;
Contudo, em todos os instantes agradeço a participação de todos,
Pois o incentivo que recebi da minha família, dos meus amigos
foi transformado em grande motivação e os obstáculos que encontrei,
foram como desafios, que para vencê-los, precisei ter uma grande determinação.

No decorrer da vida, muitos obstáculos e barreiras surgem, em todas as direções e sentidos.
Uns naturais e a maioria deles artificiais;
Estes existem para serem superados ou para nos inibir;
Apenas os que acreditam em seus ideais;
é que passam para o novo estágio de sua vida.
Esta dinâmica é uma constante e é sempre progressivo;
Estudar faz parte de rotina de quem busca o melhor para os homens e seu país...

AGRADECIMENTOS

Após 5 anos intercalados de convivência e longe dos meus, mais um ciclo se fecha. Em 26 de Julho de 2005, reentrava na vida acadêmica iniciando a versão de pesquisador. Agora está terminando o doutorado. Esta fase de vida foi essencial para a sua formação como profissional e mais uma vez como pessoa.

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

Ao Prof^o. Dr. Aivaldo Henrique da Fonseca, orientador, do Laboratório das Doenças Parasitárias, Departamento da Epidemiologia e Saúde Pública, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) por quem sento uma grande admiração, pela atenção e dedicação dispensada desde os primeiros contatos realizados via correio eletrônico e a convivência nestes três anos. Por ter entendido minhas dificuldades, acreditando mesmo me o conhecer e especialmente por ter ensinado com atitudes e palavras que a ética e a responsabilidade são características essenciais em qualquer profissional.

À Prof^a. Dra. Cristiane Divan Baldani, do Instituto de Veterinária, Departamento de Clínica e Medicina Veterinária da UFRRJ, por quem tenho grande admiração e amizade, pelos ensinamentos e pelas “dicas” de quem tem um pouquinho mais de experiência e com muita vontade de compartilhar e transmitir o seu saber.

Ao Prof^o. Dr. Carlos Luiz Massard, do Instituto de Veterinária, Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ, pelos ensinamentos, confiança e total disponibilização do seu laboratório.

Ao Prof^o. Dr. Huarrisson Azevedo Santos, do Instituto de Veterinária, Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ, pelos ensinamentos e total disponibilidade para ajudar e ensinar o ABC da biologia molecular.

Ao Prof^o. Dr. Carlos Wilson Gomes Lopes, do Instituto de Veterinária, Laboratório de Coccídios e Coccidioses, Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ, pelos ensinamentos, confiança e total disposição em ajudar e por ter me recebido tão bem em seu Laboratório.

Ao Prof^o. Dr. Leandro Azevedo Santos e todos os colegas do Laboratório de mineração e Plantas, do Instituto de Agronomia da UFRRJ, pelos ensinamentos e ajuda e por estarem à disposição para ajudar em qualquer momento.

Ao Dr. Walter Flausino, do Instituto de Veterinária, Laboratório de Coccídios e Coccidioses, Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ, pelos ensinamentos, confiança e total disposição em ajudar em seu Laboratório.

Ao Dr. Daniel da Silva Guedes Junior, da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), pelos ensinamentos e ajudar e “dicas” de quem sabe um pouco mais e com conhecimento de causa.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte-Embrapa- MS, pelo fornecimento dos antígenos e controles positivos e negativos de *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale*, utilizados nos testes de ensaio de imunoadsorção enzimática indireta (ELISA-I).

Ao Prof^o. Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro do Laboratório de Protozoologia, do Instituto das Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pelo fornecimento dos controles positivos utilizados nas reações em cadeia de polimerase para *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale*.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro e ao Ministério de Ciência e Tecnologia de Moçambique (MCT-Mz) pela oportunidade concedida.

A todos os colegas e professores do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro

Aos funcionários do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e do Departamento de Parasitologia Animal pela atenção dispensada nas inúmeras solicitações.

Aos amigos e colegas dos Laboratórios de doenças parasitárias no Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, de Hemoparasitos e Vetores, na Estação para Pesquisas parasitológicas W. O. Neitz e Laboratório de Coccídios e Coccidioses pelo apoio, convívio acadêmico e amizade, muito obrigado por tudo.

Aos colegas Gisele Meireles e Charles Passos Rangel representantes dos discentes do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, gestão 2009, pelo apoio, amizade e por ter proporcionado uma visita ao Cristo Redentor, Deus lhes abençoe.

Enfim, gostaria de exteriorizar agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram, de alguma forma, para a realização deste sonho.

Por último, resta expressar meus agradecimentos a todos, como no meu país, quando expressamos com forte emoção! *Khanimambo*.

O MEU MUITO MUITO OBRIGADO!!!

BIOGRAFIA

António Amélia dos Santos Mucalane Tembue, filho de Mucalane Jeque Tembue e de Amélia Saete Boque, natural de Chidenguele, Distrito de Manjacaze, Província de Gaza, nascido em 20 de dezembro de 1962.

Recebeu educação primária na Escola Primária de Canda, Distrito de Zavala, na Província de Inhambane (1ª e 2ª classes). Devido à distância entre a Escola e a casa de seus pais, foi transferido para a Escola Primária de Denguine (3ª e 4ª classes), posto administrativo de Chidenguele, Distrito de Manjacaze, na Província de Gaza, vale salientar que a frequência da 4ª classe foi interrompida no meio do ano letivo por uma ordem das autoridades portuguesas que interdavam a continuação de estudos a todos aqueles que estivessem com idade avançada em relação à classe em que se encontrava naquela época (1974).

Em 1 de Janeiro de 1975 saiu de casa, na zona rural em Denguine, com destino a Maputo, capital do país, tendo começado a trabalhar como empregado doméstico para garantir o seu sustento.

Com a independência de Moçambique em 25 de Junho de 1975, o novo governo de Moçambique autorizou os moçambicanos a estudar sem estabelecer limite da idade. Assim, retornei a sala de aula no ano letivo de 1976, cursando a 4ª classe, noturna na Escola Primária Sete de Setembro em Maputo.

Realizou o primeiro ciclo preparatório na Escola Secundária Estrela Vermelha também em Maputo, onde frequentei a 5ª e 6ª classes em 1977 e 1978, no curso noturno.

Por ter obtido um bom aproveitamento escolar foi selecionado para estudar na Escola Secundária da Namaacha onde concluiu o segundo ciclo do ensino Secundário geral 7ª, 8ª e 9ª classes de 1979 a 1981.

De 1982 a 1983, cursou o terceiro ciclo, o ensino médio 10ª e 11ª classes na Escola Secundária Francisco Manyanga e por solicitação da Direção Provincial de Educação e Cultura lecionou como professor eventual nas classes inferiores do ensino secundário geral de Março de 1982 a dezembro de 1992, as disciplinas de geografia, química e biologia.

Em 1985, ingressou na Universidade Eduardo Mondlane, Faculdade de Medicina Veterinária, concluindo o curso em 18 de Agosto de 1992, já funcionário do Instituto de Produção Animal (IPA), subordinado ao Ministério da Agricultura.

De 12 de Janeiro de 1993 a 21 de Julho de 2001, foi nomeado diretor da Estação Zootécnica Central da Chobela e supervisor técnico da Estação Zootécnica de Mazimuchopes, no Distrito de Magude, na Província de Maputo. As duas estações se dedicam a investigação Agro-Pecuária e hoje pertencem ao Instituto de Investigação Agrária de Moçambique, subordinada ao Ministério de Agricultura.

Foi supervisor de campo de um projeto de criação de pequenos ruminantes no setor familiar no posto Administrativo de Motaze, Distrito de Magude em 1998 a 1999.

Responsável pela seleção e formação dos promotores para assistência veterinária e gestores de tanques carrapaticidas, pertencentes ao setor familiar no Distrito de Magude, no âmbito do repoavamento pecuário, supervisionado pela vetaid (ONG Britânica).

Foi Médico-Veterinário responsável pela realização da quarentena de alguns lotes de bovinos importados da República da África do Sul e do Zimbabwe pela Direção Nacional de Pecuária, no âmbito do projeto de repovoamento pecuário de Moçambique a partir de 1996 a 2001.

De Agosto 2001 a Junho 2005, por despacho de S. Excia o Ministro de Agricultura e Desenvolvimento Rural foi nomeado Director Distrital de Agricultura e Desenvolvimento Rural de Moamba em comissão de serviço, na Direcção Provincial de Agricultura e Desenvolvimento Rural de Maputo.

Como técnico e gestor, participou de vários “workshops” e cursos de curta duração

dentro e fora do país, destacando-se o “Artificial Insemination in cattle and management” no Japão em 1994; liderança e dinâmica de grupos, mediação, negociação e transformação de conflitos; repovoamento pecuário no pós-conflito armado em Moçambique.

Em 2004, mediante o processo seletivo do Programa Internacional de Pós-Graduação da Fundação Ford dos Estados Unidos da América, em Nova York, administrado pela Africa America Institute em Moçambique, foi aprovado em 4º lugar para frequentar o curso de Pós-Graduação em nível de mestrado em Ciências Veterinárias, no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), como bolsista da “Ford Foundation International Fellowships Program, New York, USA.

Ingressou no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na UFRPE de 26 de Julho de 2005, tendo concluído em 18 de Maio de 2007, retornando ao país em 14 de Junho de 2007.

De 2006 até ao presente momento, está lotado no Instituto de Investigação Agrária de Moçambique, na Direção de Ciências Animais no Laboratório Central de Veterinária, seção de Parasitologia, como Investigador na área de Sanidade Animal.

Em 2008 participou na elaboração conjunta com a Universidade Federal de Bahia (UFBA), de um projeto intitulado “Perfil parasitário de caprinos e bovinos no Distrito de Angónia, Tete, Moçambique”, com ênfase na avaliação de resistência aos antiparasitários, aprovado e financiado pela CNPq/Brasil (Número do processo: 490499/2008-2).

Também em 2008, mediante processo seletivo resultante dos acordos de cooperação bilateral e transferência de tecnologia entre o governo da República de Moçambique e a República Federativa do Brasil, administrado pelo Programa de Desenvolvimento dos Recursos Humanos em Ciência e Tecnologia (PDHCT) do Ministério de Ciência e Tecnologia de Moçambique (MCT-Mz) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq/MCT) do Brasil, foi aprovado em segundo lugar para frequentar curso de Pós-Graduação em instituição de ensino superior no Brasil.

Em março de 2009, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias nível de doutorado na Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro (UFRRJ), Área de Concentração Sanidade Animal, como bolsista do CNPq, até o presente momento. Nesta data, apresenta e defende esta tese como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

É membro participante de vários projetos de pesquisas desenvolvidos em cooperação aos grupos de pesquisa/CNPq; Hemoparasitos de Importância Veterinária, no Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, no Instituto de Veterinária, (UFRRJ).

Em 2010, submeteu e aprovou um projeto ao Fundo Nacional de Investigação (FNI), um projeto intitulado: “Projeto de melhoramento da capacidade de diagnóstico e investigação do Laboratório Central de Veterinária”, Direção de Ciências Animais, Maputo.

Durante o período da formação acadêmica participou em vários projetos de pesquisas, que resultaram em 28 publicações científicas, em periódicos indexados, congressos e outros eventos científicos.

“A grandeza de uma nação e seu progresso moral se pode julgar de acordo com a maneira com que se tratam seus animais”

Gandhi

RESUMO

Tembue, António Amélia dos Santos Mucalane. **Hemoparasitos transmitidos por carrapatos e a percepção dos criadores sobre sua importância para bovinos na Região Sul de Moçambique.** 2012. 200p. Tese (Doutor em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Os hemoparasitos transmitidos por carrapatos são responsáveis por elevadas perdas econômicas e encontram-se amplamente distribuídos nas áreas tropicais e subtropicais, onde são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade, resultando em diminuição da produção de carne, leite e seus derivados. O presente estudo teve como objetivo conhecer a prevalência de anticorpos da classe IgG e a frequência de DNA nas infecções naturais por *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale* e *Borrelia* spp. em bovinos criados em sistema extensivo nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, além de estabelecer os fatores associados à idade, sexo e origem geográfica das amostras. Foram analisadas amostras de 809 soros e 240 sangues de bovinos de diferentes faixas etárias e de ambos os sexos. Utilizou-se o Ensaio de Imunoadsorção Enzimática indireto (ELISA-i) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) baseada no gene *SSrRNA* de *B. bigemina* e *B. bovis*, gene 16S rRNA de *A. marginale* e gene flagelina 16S rRNA de *Borrelia* spp. Foram encontrados 71,8%, (n = 581), 76,6% (n = 620), 76,5% (n = 619), e 85,9% (n = 695) de animais sororeagentes para *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* e *Borrelia* spp. respectivamente. Ainda foram detectados através da PCR, 11,3% (n = 27), 37,1% (n = 89), 79,2% (n = 190) e 3,8% (n = 18) de positividade para *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* e *Borrelia* spp., respectivamente. A associação significativa foi observada com relação à origem geográfica das amostras e a faixa etária pelo teste χ^2 ou exato de Fisher em nível de 5% de significância e regressão logística. Os resultados do presente estudo demonstram que os agentes estudados circulam na Região Sul de Moçambique e os bovinos podem servir como fonte de infecção para carrapatos vetores destes agentes etiológicos. A ocorrência do gênero *Borrelia* constitui-se no primeiro relato para Moçambique. Os resultados da presente pesquisa fornecem uma valiosa contribuição na compreensão da epidemiologia dos agentes etiológicos estudados na Região Sul de Moçambique.

Palavras chaves: Bovinos, doenças transmitidas por carrapatos, Moçambique, epidemiologia

ABSTRACT

Tembue, António Amélia dos Santos Mucalane. **Hemoparasites transmitted by ticks and the perception of farmers about their importance in cattle in southern Mozambique.** 2012. 200P. Thesis (Doctor in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Hemoparasites transmitted by ticks are responsible for high economic losses and are widely distributed in tropical and subtropical areas. They are responsible for high morbidity and mortality, resulting in decreased meat, milk production and their products. The present study aimed to determine the prevalence of IgG antibodies and the frequency of DNA in natural infections by *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale* and *Borrelia* spp. in beef cattle reared in extensive systems at the Provinces of Maputo, Gaza and Inhambane in southern Mozambique, as well to establish associated factors (age, sex and geographic origin of samples). A total of 809 serum and 240 blood samples of cattle with different ages and sexes. The indirect enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA) and Polymerase Chain Reaction (PCR) were used to detect IgG antibodies and SSrRNA gene of *B. bigemina* and *B. bovis*, 16S rRNA of *A. marginale* and flagellin gene 16S rRNA of *Borrelia* spp. Serology result demonstrated that 71.8% (n = 581), 76.6% (n = 620), 76.5% (n = 619), and 85.9% (n = 695) animals were positive to *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* and *Borrelia* spp., by PCR were detected positive 11.3% (n = 27), 37.1% (n = 89), 79.2% (n = 190) and 3.8% (n = 18) for *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* and *Borrelia* spp. respectively. A significant association was observed with respect to geographical origin and age of the samples in χ^2 or Fisher exact test at 5% level of significance and logistic regression. The results of this study demonstrate that the etiologic agents, studied circulates in southern Mozambique and cattle can serve as a source of infection for tick vectors of the agents. The occurrence of *Borrelia* spp. is the first report in Mozambique. The results of this research provide a valuable contribution to the understanding of the epidemiology of the etiologic agents studied in southern Mozambique.

Keywords: Beef cattle, tick-borne diseases, Mozambique and epidemiology

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1.	Características das criações de bovinos da Região Sul de Moçambique, 2010-----	49
Tabela 2.	Características dos criadores de bovinos na Região Sul de Moçambique, 2010-----	51
Tabela 3.	Percepção dos pequenos criadores de bovinos sobre a atividade pecuária na Região Sul de Moçambique, 2010-----	53
Tabela 4.	Percepção dos pequenos criadores de bovinos da Região Sul de Moçambique sobre a biologia dos carrapatos, 2010-----	54
Tabela 5.	Percepção dos criadores de bovinos da Região Sul de Moçambique sobre a importância de carrapatos na Sanidade Animal e no processo produtivo, 2010-----	56
Tabela 6.	Bases químicas e produtos comerciais utilizados pelos criadores de bovinos de carne da Região Sul de Moçambique para o tratamento de animais com suspeita de doenças transmitidas por carrapatos, 2010-----	57
Tabela 7.	Percepção dos criadores de bovinos na Região Sul de Moçambique sobre o controle dos carrapatos, 2010-----	60
Tabela 8.	Produtos carrapaticidas utilizados pelos criadores de bovinos na Região Sul de Moçambique, 2010-----	61
Tabela 9.	Prevalência de anticorpos contra <i>Babesia bigemina</i> , <i>Babesia bovis</i> e co-infecção em bovinos detectado pela reação de imunoadsorção enzimático indireto e fatores associados na Região Sul de Moçambique, 2010-----	72
Tabela 10.	Análises multivariadas das variáveis independentes em relação ao teste de ensaio de imunoadsorção enzimático indireto, para a <i>Babesia bigemina</i> em bovinos nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, 2010-----	72
Tabela 11.	Análises multivariadas das variáveis independentes em relação ao teste de ensaio de imunoadsorção enzimático indireto, para a <i>Babesia bovis</i> em bovinos nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, 2010-----	73
Tabela 12.	Frequência de detecção de DNA de <i>Babesia bigemina</i> e <i>Babesia bovis</i> pela PCR em amostras de sangue de bovinos na Região Sul de Moçambique e fatores associados, 2010-----	74
Tabela 13.	Detecção sorológica e molecular de <i>Babesia bigemina</i> , <i>Babesia bovis</i> teste de ELISA e PCR, respectivamente em bovinos da Região Sul de Moçambique, 2010-----	75

Tabela 14.	Prevalência de anticorpos anti- <i>Anaplasma marginale</i> em bovinos das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, detectados pelo ensaio imunoadsorção enzimático indireto e fatores associados, 2010-----	89
Tabela 15.	Análises multivariadas das variáveis independentes em relação ao teste de ensaio de imunoadsorção enzimático indireto para a <i>Anaplasma marginale</i> em bovinos, Região Sul de Moçambique, 2010-----	91
Tabela 16.	Frequência de DNA de <i>Anaplasma marginale</i> em bovinos das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, detectados pela reação em cadeia da polimerase e fatores associados, 2010-----	92
Tabela 17.	Detecção sorológica e molecular de anticorpos da classe IgG e DNA para <i>Anaplasma marginale</i> por ensaio de imunoadsorção enzimática indireta e reação em cadeia da polimerase, 2010-----	92
Tabela 18.	Frequência de anticorpos da classe IgG contra <i>Borrelia</i> spp., detectados pelo teste de ensaio de imunoadsorção enzimático indireto em soros de bovinos da Região Sul de Moçambique, 2010-----	107
Tabela 19.	Análises multivariadas das variáveis independentes em relação ao teste de ensaio de imunoadsorção enzimático indireto, para <i>Borrelia</i> spp. em bovinos segundo a faixa etária e a origem geográfica, Região Sul de Moçambique, 2010-----	108
Tabela 20.	Frequência de DNA da <i>Borrelia</i> spp. em bovinos das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique detectada pela reação em cadeia da polimerase e fatores associados, 2010-----	109
Tabela 21.	Detecção sorológica e molecular de anticorpos da classe IgG e de DNA para <i>Borrelia</i> spp. por ensaio de imunoadsorção enzimática indireta e reação em cadeia da polimerase, 2010-----	110
Tabela 22.	Prevalências da soropositividade através do teste ELISA indireto para <i>Babesia bigemina</i> , <i>Babesia bovis</i> , <i>Anaplasma marginale</i> e <i>Borrelia</i> spp. dos bovinos da Região Sul de Moçambique e respectivas províncias, 2010-	114

LISTAS DE QUADROS

Quadro 1. Alguns indicadores sócio-econômicos da República de Moçambique----- **6**

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1.	Localização geográfica de Moçambique, na região da África Austral-----	3
Figura 2.	Divisão administrativa da República de Moçambique e principais fronteiras-----	4
Figura 3.	Valores médios da Temperatura (C°), Índice Pluviométrico (mm) e Umidade relativa do ar (%) da Região Sul de Moçambique, ao longo do período de 2001/2009-----	6
Figura 4.	Tipo de bovinos que integram os rebanhos criados por pequenos e médios criadores das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique-----	7
Figura 5.	Localização dos locais de estudado nas três províncias da Região Sul de Moçambique (1. Chitsuleta, 2. Nhamaso-Chambale, 3. Chissibuca, 4. Chibuto, 5. Chokwé, 6. Bilene, 7. Xai-Xai, 8. Estação Zootécnica de Mazimuchopes, 9. Estação Zootécnica Zootécnica da Chobela, 10. Moamba, 11. Namaacha)-----	38
Figura 6.	Limite de detecção de DNA de <i>B. bigemina</i> pela PCR, em amostras de sangue de bovinos experimentalmente infectados, procedentes da Universidade Federal de Minas Gerais. PM– Peso molecular 1kb (Ludwig); Linha 1 - $8,63 \times 10^4$ células parasitadas/uL, Linha 2 - $8,63 \times 10^3$ células parasitadas/uL, Linha 3 - $8,63 \times 10^2$ células parasitadas/uL, Linha 4 - $8,63 \times 10^1$ células parasitadas/uL, Linha 5 – $8,63 \times 10^0$ células parasitadas/uL. A seta indicativa da banda de 458 pb correspondente ao produto de amplificação de <i>B. bigemina</i> . A análise foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE pH 8,0, contendo brometo de etídeo 0,5ug/mL-----	71
Figura 7.	Limite de detecção de DNA de <i>B. bovis</i> pela PCR, em amostras de sangue de bovinos experimentalmente infectados, procedentes da Universidade Federal de Minas Gerais. PM– Peso molecular 1kb (Ludwig); Linha 1 – $2,28 \times 10^3$ células parasitadas/uL, Linha 2 - $2,28 \times 10^2$ células parasitadas/uL, Linha 3 – $2,28 \times 10^1$ células parasitadas/uL, Linha 4 - $2,28 \times 10^0$ células parasitadas/uL. A seta indicativa da banda de 541 pb correspondente ao produto de amplificação de <i>B. bovis</i> . A análise foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE pH 8,0, contendo brometo de etídeo 0,5mg/mL-----	71
Figura 8.	Eletroforese de gel em agarose 1%, dos produtos amplificados de DNA de <i>Babesia bovis</i> pela técnica de PCR, em sangue de animais naturalmente infectados. PM: Peso Molecular, C+: controle positivo, C-: controle negativo, de 671 a 791 são amostras testes. A banda de 541 pb corresponde ao produto de amplificação da sequência de <i>B. bovis</i> -----	73

- Figura 9.** Limite de detecção de DNA de *A. marginale* pela PCR, em amostras de sangue de bovinos experimentalmente infectados, procedentes da Universidade Federal de Minas Gerais. PM– Peso molecular 1kb (Ludwig); Linha **1** - $2,19 \times 10^4$ células parasitadas/uL, Linha **2** - $2,19 \times 10^3$ células parasitadas/uL, Linha **3** - $2,19 \times 10^2$ células parasitadas/uL, Linha **4** - $2,19 \times 10^1$ células parasitadas/uL, Linha **5** – $2,19 \times 10^0$ células parasitadas/uL. A seta indicativa da banda de 458 pb correspondente ao produto de amplificação de *B. bigemina*. A análise foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE pH 8,0, contendo brometo de etídeo 0,5mg/mL----- **90**
- Figura 10.** Eletroforese de gel em agarose 1%, dos produtos amplificados de DNA de *A. marginale* pela técnica de PCR, em sangue de animais naturalmente infectados. PM: Peso Molecular, C+: controle positivo, C-: controle negativo, de 758 a 688 são amostras testes. A banda de 458 pb corresponde ao produto de amplificação da sequência de *A. marginale*----- **90**
- Figura 11.** Eletroforese de gel em agarose 1%, dos produtos amplificados de DNA de *Borrelia* spp. pela técnica de PCR, em sangue de animais naturalmente infectados. PM: Peso Molecular, C+: controle positivo, C-: controle negativo, de 139 a 762 são amostras testes. A banda de 262 pb corresponde ao produto de amplificação da sequência de *Borrelia* spp. ----- **109**

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	base purina Adenina
C	base pirimidina Citosina
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	trifosfatos desoxirribonucleotídeos
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	ensaio de imunoadsorção enzimático
G	base purina Guanina
L	litro
M	molar
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milmolar
OR	razão de chance
pb	pares de base
PBST	tampão salino fosfato Tween
PCR	reação cadeia de polimerase
pH	potencial Hidrogeniônico
pmol	picomol
q.s.p.	quantidade suficiente para
rRNA	ácido ribonucleico ribossômico
rpm	rotações por minuto
T	base pirimidina Timina
TAE	tampão Tris-Acetato-EDTA
Taq	enzima DNA polimerase isolada de uma bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
U	unidade
V	volts
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
16S rRNA	porção 16S do RNA ribossômico
18S rRNA	porção 18S do RNA ribossômico
®	marca registrada
°C	graus celsius
™	trade Mark

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL -----	1
2	REVISÃO DE LITERATURA -----	3
2.1	Características gerais de Moçambique -----	3
2.1.1	Características geográficas de Moçambique -----	3
2.1.2	População-----	3
2.1.3	Características de relevo de Moçambique-----	4
2.1.4	Hidrografia-----	5
2.1.5	Características climáticas de Moçambique-----	5
2.1.6	Características econômicas-----	6
2.1.7	Características da pecuária de Moçambique-----	7
2.1.8	A produção animal em Moçambique-----	8
2.1.9	Sanidade animal do rebanho bovino em Moçambique-----	8
2.1.10	Espécies de carrapatos em Moçambique-----	9
2.1.11	Fatores que afetam a distribuição de carrapatos transmissores de bioagentes -----	9
2.1.12	Susceptibilidade racial de bovinos aos bioagentes transmitidos por carrapatos-----	11
2.2	Gênero <i>Babesia</i> -----	12
2.2.1	Histórico-----	12
2.3	<i>Anaplasma marginale</i> -----	17
2.3.1	Histórico-----	17
2.4	<i>Borrelia</i> -----	23
2.4.1	Histórico-----	23
2.5	Técnicas de diagnóstico de hemoparasitos transmitidos por carrapatos -----	29
2.5.1	Diagnóstico de <i>Babesia bigemina</i> e <i>B. bovis</i> -----	31
2.5.2	Diagnóstico de <i>Anaplasma marginale</i> -----	32
2.5.3	Diagnóstico das espécies do gênero <i>Borrelia</i> -----	34
2.5.4	Inquérito de opinião -----	37
2.6	Material e métodos -----	37
2.7	Descrição do local de estudo -----	37
2.8	Tamanho da amostra -----	38
2.9	Coleta de amostras de sangue -----	40

CAPÍTULO I

	PERCEPÇÃO DOS CRIADORES SOBRE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS E SUA IMPORTÂNCIA EM BOVINOS NA REGIÃO SUL DE MOÇAMBIQUE -----	41
	RESUMO -----	42
	ABSTRACT -----	43
1	INTRODUÇÃO -----	44
2	MATERIAL E MÉTODOS -----	45
2.1	Descrição do local de estudo-----	45
2.2	Questionário epidemiológico-----	45
2.3	Questões abordadas aos pequenos criadores-----	46

2.4	Organização dos dados e análise-----	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	46
4	CONCLUSÕES -----	62

CAPÍTULO II

	PREVALÊNCIA SOROLÓGICA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>BABESIA BIGEMINA</i> E <i>BABESIA BOVIS</i> E FATORES ASSOCIADOS EM BOVINOS NA REGIÃO NO SUL DE MOÇAMBIQUE -----	63
	RESUMO -----	64
	ABSTRACT -----	65
1	INTRODUÇÃO -----	66
2	MATERIAL E MÉTODOS -----	67
2.1	Diagnóstico sorológico-----	67
2.2	Diagnóstico molecular-----	68
2.2.1	Extração de ácido desoxirribonucléico (DNA) -----	68
2.2.2	Obtenção de DNA dos controles positivos-----	68
2.2.3	Determinação da sensibilidade analítica das reações-----	68
2.2.4	A reação de amplificação-----	69
2.3	Elektroforese de DNA em gel de agarose-----	70
2.4	Análise estatística-----	70
3	RESULTADOS -----	70
4	DISCUSSÃO -----	75
5	CONCLUSÃO -----	81

CAPÍTULO III

	PREVALÊNCIA SOROLÓGICA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>Anaplasma marginale</i> E FATORES ASSOCIADOS EM BOVINOS NA REGIÃO NO SUL DE MOÇAMBIQUE -----	82
	RESUMO -----	83
	ABSTRACT -----	84
1	INTRODUÇÃO -----	85
2	MATERIAL E MÉTODOS -----	86
2.1	Ensaio de imunoadsorção enzimática indireto (ELISA-i)-----	86
2.2	Extração do ácido desoxirribonucléico (DNA) a partir de amostras de sangue total--	86
2.3	Obtenção do DNA do controle positivo-----	87
2.4	Determinação da sensibilidade analítica das reações em cadeia da polimerase para <i>Anaplasma marginale</i> -----	87
2.5	Reação da amplificação para <i>Anaplasma marginale</i> -----	87
2.6	Elektroforese de DNA em gel de agarose-----	88
2.7	Análise estatística-----	88
3	RESULTADOS -----	88
4	DISCUSSÃO -----	92
5	CONCLUSÃO -----	97

CAPÍTULO IV

	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR DE <i>Borrelia</i> SPP. EM BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS NA REGIÃO NO SUL DE MOÇAMBIQUE -----	98
	RESUMO -----	99
	ABSTRACT -----	100
1	INTRODUÇÃO -----	101
2	MATERIAL E MÉTODOS -----	103
2.1	Procedimentos laboratoriais-----	103
2.2.1	Obtenção do antígeno para <i>Borrelia</i> spp.-----	103
2.2.2	Obtenção do soro controle positivo para <i>Borrelia</i> spp. -----	104
2.2.3	Obtenção de controle negativo para <i>Borrelia</i> spp.-----	104
2.3	Teste de ELISA indireto-----	104
2.3.1	Descrição da reação-----	104
2.4	Extração do DNA do controle positivo-----	105
2.4.1	Reação de amplificação para <i>Borrelia</i> spp.-----	105
2.5	Eletrforese de DNA em gel de agarose-----	106
2.6	Determinação da sensibilidade analítica da PCR para <i>Borrelia</i> spp. -----	106
2.7	Análise estatística-----	106
3	RESULTADOS -----	107
4	DISSCUSSÃO -----	110
5	CONCLUSÃO -----	113
6	Comparação entre as prevalências de <i>Babesia bovis</i>, <i>Babesia bigemina</i>, <i>Anaplasma marginale</i> e <i>Borrelia</i> spp. entre os bovinos da Região Sul de Moçambique e nas províncias estudadas -----	114
7	DISCUSSÃO GERAL -----	116
8	CONSIDERAÇÕES GERAIS -----	120
9	RECOMENDAÇÕES -----	121
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	122
11	Apêndices -----	157
11.1	Apêndice 1 -----	157
11.2	Apêndice 2 -----	161
11.3	Apêndice 3 -----	164
11.4	Apêndice 4 -----	171
12	Anexos: -----	175
12.1	Anexo A -----	175
12.2	Anexo B -----	176

1 INTRODUÇÃO GERAL

Moçambique tem como base do desenvolvimento da sua economia o setor agrário e o subsetor pecuário possui um potencial imensurável e de grande importância sócio-econômica e cultural na sociedade moçambicana.

A partir do meado da década de 90 a produção pecuária tem sido amplamente praticada em todo o território nacional, visando à produção sustentável de carne, leite e outros derivados de origem animal, constituindo-se numa importante fonte protéica de qualidade superior para alimentação da população humana e uma alternativa de rendimento para a maioria das famílias rurais de baixa renda. Além disto, a produção animal tem auxiliado diretamente os trabalhadores rurais nas lavouras e no transporte de diversas mercadorias através da utilização da tração animal.

Para que a produção pecuária seja praticada de forma racional em toda a sua cadeia produtiva e maximize os poucos recursos disponíveis, faz-se necessário a busca por novas tecnologias de produção, que minimizem os gastos secundários e ampliem os índices zootécnicos do rebanho produtivo. Desta forma, o avanço de conhecimentos na área de Sanidade Animal, e em especial, na epidemiologia das enfermidades parasitárias dos animais de produção da Região Sul de Moçambique, auxiliará no desenvolvimento de formas mais eficazes de profilaxia e controle desses agentes etiológicos.

Dentre as enfermidades parasitárias transmitidas por carrapatos, destacam-se as babesioses, anaplasmose e borreliose, dentre outras. Os agentes etiológicos envolvidos são protozoários (*Babesia bigemina* e *B. bovis*) e bactérias (*Anaplasma marginale* e *Borrelia* spp.) que isoladamente ou em associação podem acometer os ruminantes.

Os animais infectados podem apresentar perda do peso, decréscimo da produção de leite, infertilidade ou subfertilidade, abortos esporádicos, altas taxas de morbidade e mortalidade, causando severos prejuízos econômicos aos criadores com gastos diretos e indiretos, devido a mortalidade e necessidade de aquisição de antiparasitários e assistência médico-veterinário.

A disseminação destes agentes no plantel de animais produtivos afeta diretamente o melhoramento genético do rebanho, pois inviabilizam a introdução de raças geneticamente melhoradas e mais produtivas, em detrimento da maior susceptibilidade a infecção por estes agentes.

A ocorrência destas hemoparasitoses está diretamente relacionada com a distribuição dos vetores transmissores, notadamente carrapatos das espécies *Rhipicephalus microplus*, *R. decoloratus*, *R. evertsi evertsi*, *R. simus* e *Hyalomma marginatum rufipes*.

Em relação *A. marginale*, além de transmissão por carrapatos, também pode ocorrer a transmissão mecânica por outros artrópodes hematófagos, assim como a transmissão iatrogênica, por meio de fômites.

Nos países tropicais e subtropicais em todo mundo, mais de um bilhão de bovinos estão expostos ao risco das infecções por estes vetores e com maior ênfase para os países da África subsahariana.

Em Moçambique, as perdas econômicas causadas por estes hemoparasitos não está quantificada, mas as estimativas feitas pelos gestores da pecuária nacional as consideram elevadas e constituem um dos principais entraves para o desenvolvimento da indústria pecuária nacional.

O conhecimento da epidemiologia dos agentes etiológicos transmitidos por carrapatos em uma determinada região geográfica é indispensável para o desenvolvimento e planejamento de programas que possam interromper a cadeia epidemiológica e reduzir os prejuízos causados à pecuária nacional pela redução de produtividade, morbidade ou mortalidade de animais através da aplicação de medidas de controle e/ou profilaxia destas

enfermidades. No entanto é necessário que os estudos epidemiológicos sejam conduzidos empregando-se métodos de diagnóstico seguros, sensíveis e específicos.

Diante dessas considerações, o presente trabalho teve como objetivo conhecer a prevalência das infecções por *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* e *Borrelia* spp. em bovinos das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, na Região Sul de Moçambique utilizando métodos de diagnósticos imunológicos e moleculares e correlacionar as frequências de infecções com possíveis fatores de riscos (idade, sexo e origem geográfica das amostras).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais de Moçambique

2.1.1 Características geográficas de Moçambique

Moçambique encontra-se situado na costa leste africana e faz parte dos países da região da África Austral. Está entre os paralelos 10° 27' e 26° 56' latitude Sul e os meridianos 30°12' e 40°51' longitude Este, Figura 1. O país possui uma superfície total de 799.380 quilômetros quadrados, sendo subdividido em dez províncias que são no sentido norte/sul: Cabo Delgado, Niassa, Nampula, Zambézia, Tete, Manica, Sofala, Inhambane, Gaza e Maputo. A cidade de Maputo é a capital do país e tem estatuto de província.

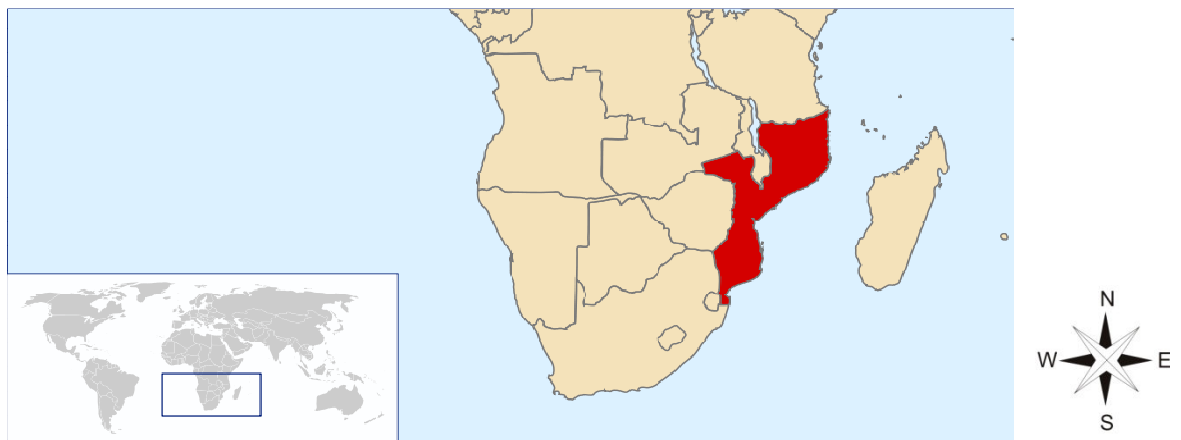


Figura 1. Localização geográfica de Moçambique, na Região da África Austral

Fonte: <http://www.google.com.br/search>.

O país possui uma extensa fronteira terrestre e marítima, sendo limitado ao norte pela República Unida da Tanzânia, a oeste e no sentido norte /sul, pelas Repúblicas do Malawi, da Zâmbia, do Zimbabwe e da África do Sul, a sul pelo reino da Swazilândia e a República da África do Sul, a leste é banhado pelo Oceano Índico numa extensão de 2.700 km, desde a ponta de Cabo delgado na divisa com a República Unida da Tanzânia no norte até a Ponta de Ouro na divisa com a República da África do sul no Sul (ATLAS, 1980), Figura 2.

2.1.2 População

A população de Moçambique é predominantemente de origem bantu e segundo dados do último recenseamento geral de população e habitação de 2007, a população moçambicana foi estimada em mais de 20.226.296 de habitantes, sendo 52% mulheres e 48% homens, tendo uma densidade populacional de 25 habitantes por quilômetro quadrado (km²), 50,1% da população está na faixa etária dos 15 aos 64 anos, 49% está entre zero e catorze anos e apenas 0,9% tem mais de 64 anos. O país apresenta uma taxa de crescimento anual de 1,8%, e a projeção indica para a duplicação da população em 2025 (INE, 2007).

A língua oficial é o português, além de 42 línguas nacionais de origem bantu faladas por diversas etnias em todo o país (INE, 2007).



Figura 2. Divisão administrativa da República de Moçambique e principais fronteiras
 Fonte: <http://.mitur.gov.mz/uteis/moz.htm>

- Capital de província
- * Capital do país

2.1.3 Características de relevo de Moçambique

O relevo é constituído por três estruturas principais: planícies, planaltos e montanhas. Apresenta uma certa sequência na sua disposição do litoral para o interior indo de planície a montanha, mas em alguns casos os planaltos e montanhas ocorrem em plena planície. A área de planícies se estende ao longo do litoral desde a foz do rio Rovuma na divisa com a Tanzânia até à Ponta de Ouro, na divisa com a África do Sul, ocupando cerca de 1/3 do território nacional, aproximadamente 250.000 km².

A maior extensão encontra-se nas províncias de Sofala, Inhambane e Gaza, tornando-se cada vez mais ampla no sentido Norte/Sul do país. As planícies são muito homogêneas, sem grandes flutuações, tendo como a altitude máxima 200 metros. A extensão de planaltos está mais acentuada na região norte e centro do país. No sul ocupam apenas uma faixa na parte ocidental nas províncias de Maputo e Gaza, ao longo da fronteira terrestre com a República da África do Sul e do Zimbabwe, formando a cordilheira dos Libombos, com altitudes superiores a 1000 metros. As principais formações montanhosas ocorrem na região centro e norte do país.

A floresta de Miombo constitui o tipo de vegetação mais vasto e dominante no Norte e Centro de Moçambique. As espécies vegetais predominantes são a *Brachystegia speciformis*, frequentemente misturada com *Jubernardia globiflora*. O segundo tipo de vegetação é a floresta de Mopane que ocorre na região do Limpopo a rio Save e no Vale do Alto Zambeze, sendo dominado pela espécie arbórea *Colophospermum mopane*. Outras três espécies arbustivas comuns incluem *Adansonia digitata* (imbondeiro ou baobá), *Alfeszia quanzensis* (chanfuta) e *Sterculia roge*.

2.1.4 Hidrografia

Os rios mais importantes de Moçambique nascem todos nos países vizinhos, atravessam o país e vão desaguar no Oceano Índico. Dentre tantos, o destaque vai para o rio Zambeze, que nasce nos planaltos de Katanga na República de Angola, atravessa a República da Zâmbia entra em Moçambique pelo Distrito de Zumbo na província de Tete, atravessa o país no sentido oeste para leste desaguardo no Oceano Índico em forma de um enorme delta. É neste rio onde se encontra a maior barragem hidroelétrica do país e da África Austral, a Cahora Bassa, que produz energia para o país e para os países da região. A parte mais espectacular do seu curso são as famosas Cataratas “Victória Falls”, na divisa entre a República da Zâmbia e do Zimbabue, sendo as maiores do mundo, com 1708 metros de extensão e uma queda de 99 metros. Este monumento natural foi inscrito pela UNESCO em 1989 na lista dos locais que são Património da Humanidade.

2.1.5 Características climáticas de Moçambique

O clima de Moçambique é influenciado pelas monções do Oceano Índico e pela corrente quente do Canal de Moçambique, sendo predominantemente, tropical úmido na região norte e em toda a zona costeira, tropical seco e árido no interior do país e clima tropical de altitude nas zonas montanhosas.

O clima apresenta duas estações bem distintas ao ano: inverno seco e frio com raras chuvas, que vai de Abril a Setembro e verão quente e chuvoso que vai de Outubro a Março. Entre as duas estações, poucas diferenças são observáveis na sua mudança do verão para inverno. A partir de Outubro/Novembro as chuvas normalmente começam a cair e continuam até Março/Abril. A quantidade de chuva na última década foi maior na região norte com uma precipitação média anual de 1.200 mm que diminui progressivamente em direção a Região Sul, com uma precipitação média anual de 400-600 mm. Nesta as chuvas são demoradas devido à influência das altas pressões do Oceano Índico e a convergência intertropical. A média de umidade relativa ar varia de 75 a 80% e aumenta na estação seca para quente e chuvosa. A temperatura média anual varia de 28 a 30°C (INAM, 2010), (Figura 3).

Na última década o efeito do fenómeno climático “El Niño” se fez sentir no país, caracterizado pelo aquecimento global das águas do oceano pacífico e que interfere em mudanças climáticas severas em todo o mundo, refletindo diretamente nas condições climáticas do continente africano em geral, e Moçambique em particular (CHIEW et al., 1998; KOVATS et al., 2003). Durante a ocorrência do “El Niño”, nos anos de 1997-1998, a região Austral e Oriental da África recebeu um volume de precipitação pluviométrica muito acima do esperado (WMO N.º.905, 2000), com isso, no Quênia ocorreram chuvas excessivas acompanhadas de enchentes, inundações e deslizamentos de terras. Em outro extremo, a Guiana, a Indonésia e a Papua da Nova Guiné foram severamente afetados por uma seca prolongada (GLANTZ, 1996; KOVATS, 2000; WOODWARD, et al., 2000; MASON; GODDARD, 2001).

Uma situação idêntica foi observada em Fevereiro do ano 2000 em Moçambique, em que chuvas atípicas e acima do normal fustigaram o país causando enchentes, inundações, mortes e destruições de infraestruturas cenários estes jamais vistas na história do país (TEMBUE, 2011)¹

¹ Comunicação pessoal

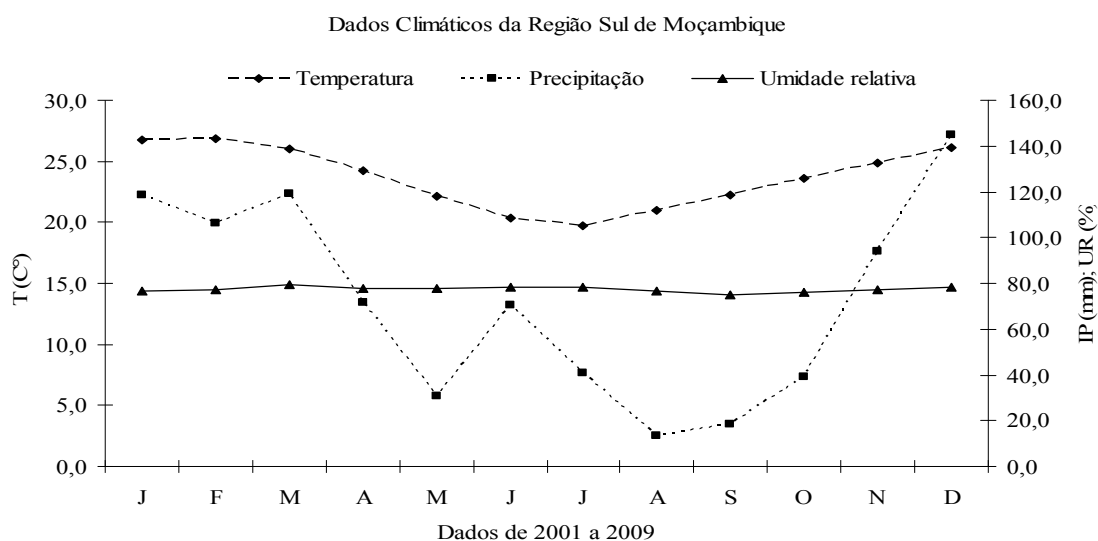


Figura 3: Valores médios da Temperatura (C°), Índice Pluviométrico (mm) e Umidade relativa do ar (%) da Região Sul de Moçambique, ao longo do período de 2001/2009.

2.1.6 Características econômicas

Moçambique tem como base do desenvolvimento da sua economia o setor agrário (agricultura, pecuária e silvicultura) e a indústria como fator dinamizador, Oitenta por cento da população vive e trabalha nas áreas rurais (WORLD BANK, 2009a; INE, 2008),

A economia do país é descrita como uma das mais pobres da África Subsaariana, embora a estatística regional indica que é a terceira mais robusta da África Austral, atrás da África do Sul e Angola, com um produto interno bruto (PIB) estimado em mais de 9 bilhões de dolares americanos e um rendimento per capita de 440 dólares (WORLD BANK, 2009b). No entanto, uma taxa de crescimento do PIB de 7,1% na última década 2000-2010, mostra que a economia está se fortalecendo depois da introdução de políticas de reformas econômicas em 1987 (WORLD BANK, 2009a), (Quadro 1).

Quadro 1. Alguns indicadores sócio-econômicos da República de Moçambique

Parâmetro	Dado	Unidade
Número de habitantes	20.894. 294	milhões
Densidade populacional	25	habitante/km ²
Taxa de crescimento natural da população	1,8	%
Expectativa de vida	48 (2008)	anos
Taxa de mortalidade infantil abaixo dos 5 anos	5/1000	nascimento
Produto Interno Bruto (PIB)	9.790.246.565	bilhões USD\$
Taxa de crescimento anual do PIB	6,7	%
Rendimento per capita/ano	440	USD\$
Contribuição do setor agrário no PIB	26 (2008)	%
Balança comercial (negativa)	-1.9	%
População com acesso a água potável	29	%
População abaixo da linha da pobreza com (-1.25)	55,5 (2003)	USD\$
População analfabeta	60,5 (2008)	%
População que trabalha no setor agrário	80	%

Fonte: Fonte: http://www.worldbank.org/data/countrydata/aag/vnm_aag.pdf
 Instituto Nacional de Estatística (INE), 2008; www.ine.gov.mz

2.1.7 Características da pecuária de Moçambique

A produção pecuária é uma atividade sócio-econômica e cultural muito importante em Moçambique e contribui significativamente para o produto interno bruto nacional (PIB) (INE, 2007). O gado bovino é tradicionalmente indígena e pode ser classificado em três tipos principais: indígenas (*Bos indicus*), mestiços *Bos indicus* com *Bos taurus taurus* e mestiços (*Bos indicus* x *Bos indicus*). O primeiro tipo, chamado de “Nguni”, também conhecido por “landim” ou “boca negra”, caracteriza-se como um bovino de médio porte fruto de uma seleção de mais de 100 anos, bem adaptado e muito tolerante a doenças transmitidas por carrapatos, e que concentram-se principalmente na Região Sul do país. O segundo tipo, chamado de “Angoni”, caracteriza-se como um bovino de pequeno porte, com chifres do tipo zebu e que concentra-se na região Centro do país, principalmente na província de Tete. O terceiro e último tipo é formado por raças não definidas que incluem apenas mestiços de diversas raças tais como “Jersey”, “Guernsey”, “Santa Gertrudes”, “Brahman”, “Simental”, “Bosmara, Tuli, Hereford”, entre outras (TIA, 2008), Figura 4.



Figura 4. Tipo de bovinos que integram os rebanhos criados por pequenos e médios criadores das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique.

A população bovina total do país é atualmente estimada em 1.600.000 cabeças, sendo que 53,6% destes se encontram concentrados na Região Sul do país. Além dos bovinos, também existem cerca de 4.747.901 caprinos, 139.000 ovinos, 340.000 suínos e 30 milhões galináceos (TIA, 2008).

Com as importações das espécies pecuárias realizadas a partir dos meados da década 90 e princípios do ano 2000, o país recebeu animais de diversas raças sendo a maioria proveniente da África do sul e do Zimbábwe, dentre bovinos, caprinos, ovinos, suínos e aves. No entanto, não houve registros das raças bovinas que entraram no país durante a

implementação do programa de repovoamento pecuário nacional, conduzido pelo governo, organizações não governamentais e iniciativas privadas (DINAP, 2004).

2.1.8 A produção animal em Moçambique

Durante um período de 10 anos (2000 a 2009), a produção animal representou 26% do valor total do PIB (INE, 2009). Os pequenos produtores usam o sistema de produção agrícola misto (culturas alimentares e a produção pecuária) que constituem uma componente econômica essencial para a sobrevivência da maioria das famílias rurais moçambicanas.

Os bovinos contribuem na produção agrícola, no preparo do solo, no transporte da colheita, na comercialização e na segurança alimentar. Os animais constituem uma reserva monetária (banco do camponês) das famílias rurais de baixa renda para os momentos de maior necessidade e é um item facilmente divisível como herança nas famílias moçambicanas (INE, 2009).

Em geral, o consumo de produtos de origem animal e seus derivados têm aumentado ao longo das últimas duas décadas, com um aumento igualmente forte no consumo de peixe, marisco e frango. Esse aumento do consumo tem sido fortemente acentuado para as populações urbanas, onde a renda tem crescido muito mais rápido e a incidência de pobreza é muito menor do que nas áreas rurais. O consumo de carne per capita é dominada pela carne de frango nacional e importada. O aumento da renda, especialmente nas áreas urbanas tem provocado mudanças significativas nas preferências alimentares e aumento de um público cada vez mais exigente que pretende diversificar o consumo de alguns produtos tradicionais como farinha de milho, o arroz, a mandioca e o feijão, com produtos alimentares ricos em proteínas de origem animal (INE, 2009).

A questão econômica faz com que o leite e outros produtos lácteos não sejam dieta tradicional dos moçambicanos. No entanto, nos centros urbanos a procura de laticínios tem crescido anualmente.

A produção animal nacional está muito longe de atender à demanda doméstica, além de que os produtos disponíveis são caros e não atendem aos padrões sanitários regional e mundial. No sistema de produção pecuária tradicional, os bovinos são criados em sistema extensivo e os pequenos ruminantes e suínos perambulam livremente nos arredores das aldeias nas comunidades. Os bovinos de pequenos produtores são conduzidos por crianças menores de idade na sua maioria não assalariados, entretanto, em muitos casos os pais das crianças trabalhadoras recebem uma bezerra em cada ano como forma de pagamento. Os animais pertencentes a diferentes criadores utilizam as mesmas áreas de pastagem, bebedouros e tanque carrapaticida (sistêmicos) ou corredor (pulverização) de tratamento comunitário, enquanto nos médios criadores os animais são conduzidos por pessoal adulto e assalariado. Os proprietários por sua vez, na sua maioria possuem áreas de pastagens e infra-estruturas pecuárias próprias (TEMBUE, 2011)².

2.1.9 Sanidade animal do rebanho bovino em Moçambique

A produção pecuária tem sido afetada por uma série de doenças que restringe a locação de animais em determinadas áreas do país e que afetam a produtividade de diferentes espécies. Porém, a informação confiável sobre a ocorrência espacial e temporal das doenças específicas, bem como do seu impacto econômico é escassa. O impacto negativo das doenças na produção pecuária se manifesta de várias maneiras, desde a mortalidade precoce, redução

² Comunicação pessoal

do peso corporal e infertilidade crônica ou temporária, redução dos rendimentos na produção de carne, bem como a redução da capacidade de trabalho (tração animal). Cada uma das doenças que afetam os rebanhos fazem com que os seus efeitos tenham graves reflexos sobre a eficiência na produção pecuária e no seu conjunto global (MORRIS, 1999; SIMLER; NHATE, 2005).

2.1.10 Espécies de carrapatos em Moçambique

A origem exata de carrapatos transmitindo doenças em animais de produção em Moçambique não está documentada, embora haja relatos de terem sido introduzidos juntamente com animais importados a centenas de anos. A produção animal em Moçambique data desde o século XVII, quando os portugueses fizeram as primeiras importações de bovinos da República da África do Sul para Moçambique (DIAS, 1960).

Os primeiros estudos documentados sobre a ocorrência de carrapatos em Moçambique foram feitos por Dias (1960), que apresentou uma lista com diversidade de espécies destes artrópodes infestando bovinos, notadamente *Amblyomma hebraeum*, *A. pomposum*, *A. theilerae*, *A. variegatum*, *Rhipicephalus microplus*, *R. decoloratus*, *R. appendiculatus*, *R. capensis*, *R. compositus*, *R. evertsi evertsi*, *R. lunulatus*, *R. maculatus*, *R. sanguineus*, *R. simus*, *R. kochi*, *R. zambeziensis*, *Haemophysalis leachi*, *Hyalomma rufipe* e, *H. truncatum*.

O mesmo autor, três décadas depois, apresentou outra relação de carrapatos infestando caprinos e ovinos, nomeadamente *A. hebraeum*, *R. microplus*, *R. appendiculatus*, *R. evertsi evertsi* e *R. simus*. Também apresentou uma listagem de 12 espécies de carrapatos parasitando cães, sendo estes, *A. hebraeum*, *A. tholloni*, *Haemaphysalis humerosoides*, *H. leachi*, *Ixodes pilosus*, *R. appendiculatus*, *R. kochi*, *R. muelhensi*, *R. reichnetzi*, *Rhipicephalus sanguineus*, *R. simus* e *R. tricuspis* (DIAS, 1993).

Neves et al. (2004), reportaram ocorrência de *Haemaphysalis spinulosa*, *R. microplus*, *R. pravus group*, *R. turanicus* infestando cães.

Recentemente, De Matos (2008) reportou que das 14 espécies de carrapatos de Ixodideos mapeadas na província de Maputo, Região Sul de Moçambique, *A. hebraeum*, *R. microplus*, *R. appendiculatus*, *R. evertsi evertsi*, *R. simus* e *R. decoloratus* se encontram amplamente distribuídas, tendo notificado pela primeira vez a ocorrência de *Haemaphysalis elliptica*, *Ixodes cavipalpus*, *R. longus* e *R. turanicus* em Moçambique, e sugerido que estes provavelmente tenham sido introduzidas recentemente com animais importados dos países vizinhos.

Com as condições edáfico-climáticas favoráveis no país, ocorre o rápido desenvolvimento e a manutenção dos hospedeiros invertebrados parasitando várias espécies de animais entre domésticos, silvestres, de companhia e também o próprio homem (NEVES et al., 2004; DE MATOS et al., 2008).

Em termos regionais, a variabilidade climática sazonal tem demonstrado a sua influência na transmissão de doenças por artrópodes, uma vez que a sobrevivência e abundância destes dependem de um clima e umidade adequados (SONENSHINE, 1993).

2.1.11 Fatores que afetam a distribuição de carrapatos transmissores de agentes etiológicos

A distribuição de carrapatos em Moçambique é influenciada por vários fatores, em especial o clima, a vegetação, a precipitação, a temperatura e a presença de uma diversidade de hospedeiros vertebrados entre domésticos e silvestres.

Nas regiões Central e Oriental de África as condições climáticas para o desenvolvimento do ciclo biológico dos carrapatos estão presentes durante todas as estações do ano. Em contraste, na região da África Austral, as estações do ano estão bem definidas compreendendo verão e inverno e um período curto de chuvas, havendo deste modo um padrão de ocorrência sazonal das doenças transmitidas por carrapatos e regulados por carrapatos adultos por meio da diapausa (PEGRAM; BANDA, 1990; BERKVENS et al., 1995; MATTIOLI et al., 1997).

A diapausa é um estado neurohormonal caracterizada por baixa atividade metabólica dos carrapatos que está associada a morfogênese reduzida, para permitir maior resistência as condições ambientais adversas. A diapausa não só afeta o ciclo de vida e a sobrevivência dos carrapatos mas também influencia na epidemiologia das doenças por eles transmitidas (PEGRAM; BANDA, 1990; BERKVENS et al., 1995; MATTIOLI et al., 1997).

Em áreas onde não há diapausa, todas as fases do ciclo de vida ocorrem simultaneamente tanto em hospedeiros vertebrados quanto em invertebrados durante todo o ano com a presença de animais clinicamente doentes, bem como de portadores são (SONENSHINE; MATHER, 1994).

Supõe-se que o padrão sazonal de algumas espécies de carrapatos como *R. appendiculatus* e *R. zambeziensis* seja definido pelos carrapatos adultos, que só são ativos sob condições climáticas específicas relativas à temperatura, precipitação e umidade relativa do ar (RANDOLPH, 1997).

Randolph (1993) afirmou que a dessecação e a vulnerabilidade das larvas as condições extremas do meio ambiente determinou o padrão da dinâmica sazonal de *R. appendiculatus* e *R. zambeziensis* na África Austral. As temperaturas mínimas noturnas determinam a condensação e o déficit de saturação do ar e, portanto, a capacidade dos carrapatos reporem a umidade perdida durante o dia, enquanto que as larvas são mais sensíveis a esses fatores. O cumprimento do calendário das atividades de ninfas e adultos é determinado pela temperatura, precipitação e umidade relativa, mais o fenômeno de diapausa para garantir a reprodução e sobrevivência máxima de modo a assegurar a ocorrência de ovos e larvas em períodos de condições climáticas ideais.

A ocorrência de muitos artrópodes vetores responsáveis pela transmissão de muitos bioagentes causadores de doenças parasitárias e infecciosas em animais e humanos tem sido influenciado pelo clima (TONG et al., 2000; KOVATS et al., 2003).

McMichael e Kovats, (2000) reportaram que o campo de investigação epidemiológica com base na influência de fatores climáticos sobre a doença requer informações suficientes que permitam a diferenciação entre os efeitos da co-existência climática e dos fatores não climáticos.

As mudanças de eventos meteorológicos podem ter um efeito significativo sobre as taxas de reprodução de artrópodes e assim influenciar a sua abundância global (WALKER, 1932; KOVATS, 2000; McMICHAEL, 2000). Existem estudos epidemiológicos que relacionam o efeito “El Niño” e o aumento do risco de doenças na saúde humana, como a malária e outras doenças tropicais transmitidas por artrópodes em áreas geográficas específicas devido a variação climática e relacionado diretamente ao efeito “El Niño” (LINDBLADE et al., 1999; KOVATS, 2000).

O efeito do “El Niño”, portanto, fornece uma oportunidade para ilustrar a importância da base ecológica para muitas doenças transmitidas por artrópodes e portanto, precisa ser levado em consideração pelos profissionais das diversas áreas de conhecimentos, decisores políticos e o público em geral.

A vegetação é muito importante para carrapatos, pois proporciona as boas condições microclimáticas e aumenta as chances dos carrapatos encontrarem um hospedeiro vertebrado para se alimentarem seja ele doméstico ou silvestre (LESSARD et al., 1990). Além disso, a

vegetação aumenta as chances de sobrevivência dos carrapatos nos estágios de vida livre. Quando a cobertura vegetal é reduzida pelo sobrepastoreio e remoção de árvores, os carrapatos tendem a desaparecer. A ausência de carrapatos em áreas com condições agroecológicas adequadas, como as da África Ocidental tem sido atribuído à baixa densidade de bovinos e de outros hospedeiros herbívoros (NORVAL et al., 1988).

2.1.12 Susceptibilidade racial de bovinos aos agentes etiológicos transmitidos por carrapatos

Estudos demonstram que diferentes raças de bovinos apresentam certas habilidades hereditárias para se tornarem imunologicamente resistentes à infestações por carrapatos, constituindo-se num componente vital no seu combate (BOCK et al., 1997; 1999a,b).

Eles são particularmente importantes no controle de carrapatos. No entanto, esta abordagem não é isenta de dificuldades. Para os hospedeiros vertebrados de muitas espécies de carrapatos, a resistência não pode ser desenvolvida simplesmente para a resistência da raça a carrapatos, é necessário também a preservação de outras características produtivas desejáveis, como alta produção de leite e carne (BOCK et al., 1997; 1999a,b).

Uma abordagem mais racional no controle integrado de carrapatos foi sugerida por Young et al. (1988), que citam, dentre algumas medidas, a seleção de bovinos resistentes à infestação por carrapatos, além de utilização de manejo rotacional de pastagens, assim como a utilização de métodos de imunização e controle estratégico destes ectoparasitos, para a obtenção de resultados satisfatórios no controle de doenças por eles transmitidas.

Na África Subsaariana, o controle de carrapatos e doenças por eles transmitidas é fundamental em termos de sanidade animal, gestão pecuária e saúde pública apresentando um problema de magnitude superior onde se destacam a anaplasiose, babesiose, ehrlichiose e theileriose (NORVAL et al., 1978; YOUNG et al., 1988; SIMUZZA et al., 2011).

Os ruminantes domésticos de origem indiana (*Bos indicus*) têm demonstrado graus variáveis de tolerância a estas doenças. As raças locais de bovinos como landim (Nguni), parecem apresentar maior resistência a diversas enfermidades (NORVAL et al., 1978; MELTZER, 1996). A maioria dos rebanhos bovinos são constituídos por bovinos de raça landim e seus mestiços.

O bovino landim é pertencente ao tronco *Bos indicus*, bastante tolerante a doenças transmitidas por carrapatos. A pequena população de bovinos mestiços *Bos taurus taurus* é encontrada em pequenas áreas restritas na província de Maputo, nos Distritos de Magude e Boane e na província de Manica no centro de Moçambique (TIA, 2008). Animais mestiços têm mostrado alta susceptibilidade à ehrlichiose e outras doenças transmitidas por carrapatos dependendo do grau de sangue e com uma taxa de mortalidade elevada superior a 4% ao ano (DINAP, 2004).

As espécies de carrapatos *Amblyomma hebraeum* e *Amblyomma variegatum* são referenciadas como as principais espécies de ixodídeos que mais ocorrem em Moçambique parasitando ruminantes domésticos, e estas tem sido incriminadas como um dos principais fatores limitantes ao melhoramento genético da pecuária nacional (DIAS, 1960; 1993). Em estudo recente foi observado que o pico de abundância das espécies de carrapatos adultos na província de Maputo ocorre durante a estação chuvosa, de Outubro a Abril e das ninfas na estação seca, de Maio a Setembro (DE MATOS, 2008). Como consequência casos frequentes de mortes súbitas causadas por carrapatos tem sido reportados em pequenos ruminantes e raramente em bovinos autóctones nos Distritos de Magude e Moamba na província de Maputo, Região Sul de Moçambique (dados não publicados).

2.2 Gênero Babesia

2.2.1 Histórico

Espécies deste gênero caracterizam-se como protozoários intra-eritrocitários obrigatórios, do filo Apicomplexa, que possuem sua transmissão relacionada à carrapatos da família Ixodidae (LEVINE, 1988; ALLSOPP et al., 1994). Desta forma, o desenvolvimento biológico destes agentes é dependente de dois hospedeiros: um hospedeiro invertebrado (carrapato) e um hospedeiro vertebrado (mamífero) como, por exemplo, o bovino.

Este gênero foi descrito inicialmente no final do século XIX por um microbiologista e patologista húngaro, no leste Europeu, quando ele e a sua equipe examinavam esfregaços de sangue e observaram a presença de micro-organismos semelhantes a bactérias no interior de eritrócitos de bovinos com um quadro clínico anemiante, denominado-os de *Haematococcus bovis*. Os autores associaram a presença destes com a doença, chamada na época de hemoglobinúria enzoótica bovina ou “redwater fever” (BABES, 1888). Tempos depois o mesmo autor observou também micro-organismos semelhantes em amostras de sangue de ovinos.

Cinco anos mais tarde, na América do Norte, pesquisadores dos Estados Unidos da América reportaram a ocorrência de uma doença que se caracterizava por altas taxas de morbidade e mortalidade em bovinos e com sintomatologia muito semelhante aquela reportada na Europa por Babés (1888). Os autores destacaram a presença de micro-organismos intra-eritrocitários no sangue dos animais, sendo caracterizado como um protozoário, denominando-o de *Pyrosoma bigeminum* (SMITH; KILBORNE, 1893).

Em estudos subsequentes comprovaram que este micro-organismo era transmitido por artrópodes, carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (SMITH; KILBORNE, 1893), sendo este o primeiro achado que incriminava os artrópodes como sendo responsáveis pela transmissão de agentes patogênicos.

Starcovici (1893) observou certa similaridade entre os micro-organismos descritos por Babés (1888), na Romênia e por Smith e Kilborne (1893), na América do Norte e propôs a inclusão de ambos em um novo gênero chamado *Babesia*, atribuindo em seguida os nomes de *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Babesia ovis* em homenagem ao pesquisador húngaro.

A importância histórica da contribuição do cientista Victor Babés foi ressaltada em um fórum científico internacional sobre a babesiose realizado em Nice na França, onde foi discutido e alcançado um consenso sobre a utilização dos termos *Babesia* e *Piroplasma* como sinônimos (UILENBERG, 2006).

A babesiose bovina é responsável por elevadas perdas econômicas e encontra-se amplamente distribuída em vários países tropicais e subtropicais localizados entre as latitudes 32°N em e 30°S do mundo, infectam uma grande variedade de espécies animais entre domésticos e silvestres, e em determinadas situações inviabilizam os programas de melhoramento genético com raças taurinas e seus cruzamentos (HOMER et al., 2000; BOCK et al., 2004).

Nos últimos 50 anos, as doenças causadas por agentes transmitidos por carrapatos têm despertado maior interesse a comunidade científica devido ao aumento do trânsito de animais de produção e de companhia, além do fato de que muitas espécies de carrapatos estão se adaptando a diferentes condições edáfico-climáticas. Outro fator importante para a disseminação destas doenças está relacionado a capacidade que muitas espécies de carrapatos possuem em poderem transmitir simultaneamente, vários patógenos (SCHOULS et al., 1999).

Atualmente são conhecidas mais de cem espécies de *Babesia* em todo o mundo, doze destas foram reportadas no continente africano (UILENBERG, 2006), mas aquelas de maior importância econômica para os bovinos são *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* (BÖSE et.,

1995; BOCK et al., 2004; ALFREDO et al., 2005; MARTINS et al., 2008; TEMBUE et al., 2011a).

Esta doença está intimamente relacionada com a presença dos carrapatos das espécies *Rhipicephalus microplus*, *R. decoloratus*, *R. annulatus* e *R. geigyi*, sendo estes considerados os únicos vetores biológicos na África subsahariana e responsáveis pela disseminação dos hemoprotozoários (BOCK et al., 2004). O carrapato *Rhipicephalus* é originário do continente asiático, mas disseminou-se em diversas regiões do planeta devido ao comércio internacional de animais de produção.

A distribuição e as preferências ecológicas do carrapato *Rhipicephalus* na África têm sido descritas por Estrada-Peña et al. (2006). Os fatores edáficos-climáticos requeridos pelos carrapatos *R. microplus* e *R. decoloratus* são semelhantes, pois ambas as espécies exigem baixa precipitação pluviométrica e alta umidade relativa do ar.

No entanto, apesar destes requisitos serem semelhantes, as duas espécies não ocorrem em conjunto, devido à competição entre elas (ESTRADA-PEÑA et al., 2006). Devido ao menor ciclo biológico e a ausência de resistência por parte do hospedeiro vertebrado, *R. microplus* possui um maior potencial frente a população de hospedeiros, quando comparado a espécie *R. decoloratus* (DE WAAL; COMBRINK, 2006). Estas espécies de carrapatos ocorrem e estão amplamente distribuídas nas regiões Oriental, Central e Austral de África, sendo esta última, onde se encontra geograficamente localizada Moçambique.

Os principais vetores de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em Moçambique são carrapatos das espécies *R. microplus*, *R. annulatus* e *R. geigyi* (DE MATOS, 2008), sendo que as espécies de carrapatos de *R. decoloratus* e *R. evertsi evertsi* transmitem apenas *B. bigemina* (BOCK et al., 2004). Os bovinos se infectam pela inoculação de esporozoítos presentes nas glândulas salivares do carrapato no ato do repasto sanguíneo. A inoculação ocorre nas fases de larva, ninfa e adulto do carrapato para *B. bigemina* e *B. bovis* (RIEK, 1964; 1966).

Uma vez na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, ocorrem à invasão dos eritrócitos pelo parasita, através de um mecanismo mediado por ácidos presentes nas organelas que formam o complexo apical do protozoário, sem causar o rompimento celular, inicialmente. No interior dos eritrócitos, os parasitas saem do vacúolo parasitóforo e se transformam em merozoítas, multiplicando-se por divisão binária, dando origem a dois merozoítas, e estes rompem a célula parasitada e penetram em outro eritrócito, promovendo a sua multiplicação e disseminação pelo organismo do hospedeiro vertebrado (BOCK et al., 2004). A infecção dos vetores por *Babesia* spp. ocorre durante o repasto sanguíneo dos carrapatos em animais infectados e com parasitemia.

No organismo dos hospedeiros invertebrados, os merozoítas presentes nos eritrócitos parasitados sofrem alterações morfo-fisiológicas, dando início a fase sexuada do parasito. De aspecto ovóide, esta fase do ciclo do parasito foi classificada como gamontes e se caracteriza como a forma infectante para o carrapato vetor (FRIEDHOFF, 1988).

Desta forma, os gametas masculinos e femininos se juntam e formam o zigoto, de aspecto móvel que penetra nas células do epitélio intestinal do carrapato, multiplicando-se por esporogonia, dando origem aos esporocinetos em forma de arco, sendo então liberados na hemocele (MACKENSTEDT et al., 1995; MOSQUEDA et al., 2004).

Devido a mobilidade, os esporocinetos têm a capacidade de invadirem vários órgãos do carrapato, iniciando desta forma múltiplos ciclos de esporogonia, que se prolongam até a morte das fêmeas ingurgitadas após a ovoposição (BOCK et al., 2004). Através deste mecanismo, as espécies de *Babesia* spp. são capazes de infectar os ovários das fêmeas de carrapatos, infectando desta forma a próxima geração, denominando este mecanismo de transmissão transovariana. Uma vez infectado os ovos das fêmeas, os parasitas passam por vários ciclos de esporogonia nos embriões e larvas e é este processo que garante a presença de inúmeros esporozoítos nas glândulas salivares dos carrapatos jovens (BOCK et al., 2004). A

esquizogonia ocorre com o desenvolvimento de esporocinetos nas células basofílicas na hemolinfa dos carrapatos (AGBEDE et al., 1986).

Após a eclosão das larvas, os esporocinetos migram para as glândulas salivares, onde ocorre a esporogonia das fases multinucleadas e mais tarde dividem-se para formar esporozoítos, caracterizada como a forma infectante (MACKENSTEDT et al., 1995). Nesta fase, os esporocinetos são haplóides e podem infectar uma grande variedade de células, incluindo oócitos, onde ocorrem ciclos secundários de esquizogonia. Assim, a transmissão transovariana ocorre com maior desenvolvimento na fase larval e esta constitui a forma fundamental da manutenção da endemia da babesiose, que garante a sua ampla distribuição em diferentes regiões geográficas nos países tropicais e subtropicais (MEHLHORN; SCHEIN, 1984).

Esta é uma adaptação importante, uma vez que carrapatos do gênero *Rhipicephalus* são monoxênicos.

Na década de 60, Riek (1964, 1966) descreveu a sequência de eventos biológicos que culminavam com a transmissão transovariana de *B. bigemina* e *B. bovis*. A partir desses relatos se despertou uma curiosidade científica e várias pesquisas foram sendo realizadas com o intuito de se esclarecer as interações entre as diferentes espécies de *Babesia* e os carrapatos (POTGIETER; ELS, 1976; CAFRUNE; AGUIRRE, 1995; GUGLIELMONE et al., 1997).

O ciclo biológico de *B. bigemina* e *B. bovis* segue padrões semelhantes no hospedeiro invertebrado (POTGIETER; ELS, 1977). Várias pesquisas tem sido direcionadas aos estudos do ciclo de vida dos carrapatos para se entender as diferenças morfológicas nas diversas formas evolutivas de *B. bigemina* e *B. bovis* no próprio vetor (POTGIETER; ELS, 1976; GUGLIELMONE et al., 1996a).

Desta forma, foi possível avaliar diversos efeitos do parasitismo por *Babesia* spp. sobre os hospedeiros invertebrados e a partir dos resultados, ampliar o conhecimento sobre aspectos epidemiológicos da infecção por carrapatos (SANTOS, et al., 1998; CEN-AGUILAR et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2005).

Estes achados podem ser observados nos estudos realizados por Mahoney; Mirre (1971), quando observaram que a frequência de infecções por *B. bigemina* foi de 30% e que para *B. bovis* esta variou de 22 a 30% nas fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* obtidas de bovinos experimentalmente infestados.

Em estudos posteriores foi possível verificar que as taxas de infecção por *Babesia* spp. nas fêmeas de carrapatos podiam ser influenciadas por uma série de fatores relacionados aos hospedeiros vertebrados, tais como a raça, a idade, a parasitemia, assim como o tempo de incubação das fêmeas dos hospedeiros invertebrados (GUGLIELMONE, 1992; GUGLIELMONE et al., 1997; SANTOS et al., 1998; QUINTÃO-SILVA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005).

A infecção dos hospedeiros vertebrados ocorre com a fixação dos ixodídeos nas fases larval, ninfal e adulto durante o repasto sanguíneo dos carrapato (RIEK, 1964, 1966). Para *B. bigemina*, o período pré-patente varia entre 12 a 18 dias após a infecção (BOCK et al., 2004). Com relação a *B. bovis*, como não persiste em uma forma infectante em carrapatos para além do estágio larval (MAHONEY; MIRRE 1979), o período pré-patente varia entre 6-12 dias e pico da parasitemia ocorre entre 3 a 5 dias após a infecção (BOCK et al., 2004).

No entanto, particularmente em regiões de clima quente, o período pré-patente fica curto podendo haver infecções em apenas três dias após a fixação de carrapatos (DALGLIESH; STEWART, 1982).

A prevalência da infecção e o aparecimento da doença são determinados por complexas interações entre o hospedeiro vertebrado, o hospedeiro invertebrado e o parasita (JONSSON et al., 2008).

Em áreas tropicais e subtropicais com uma população alta e diversificada de carrapatos, a exposição natural geralmente ocorre ainda na idade precoce, quando os animais ainda estão protegidos naturalmente, pelos anticorpos maternos permitindo que a imunidade adquirida possa desenvolver anticorpos suficientes para reagirem aos desafios naturais posteriores quando adultos (BOCK et al., 2004).

Em um estudo recente, Magona et al. (2008) observaram uma associação negativa entre idade e do risco de soroconversão para *B. bigemina* em bovinos *Bos indicus* mantidos em desafio natural na Uganda, na África Central. Este fenômeno encontra explicação pela presença de um grande número de animais adultos soropositivos, devido à contínua exposição a carrapatos infectados, reduzindo assim a proporção de indivíduos susceptíveis na população (MAGONA et al., 2008).

Este cenário representa uma situação de estabilidade endêmica, em que todos os animais com idade inferior a seis meses tiveram um contato prévio com os hemoparasitos sem apresentar nenhuma doença clínica (NORTON et al., 1983). Em contrapartida, em situações em que os animais não tiveram contato com o carrapato vetor, a ocorrência da babesiose é inversamente proporcional a idade, isto é, animais jovens é que possuem resistência a infecções devido à imunidade inata, enquanto os animais mais velhos são muito sensíveis (JONGEJAN et al., 1988; MAHONEY et al., 1973). A imunidade adquirida passivamente do colostro dura aproximadamente 2 a 3 meses, mas logo é seguida por imunidade inata a partir dos três a nove meses de idade. Por isso, bezerros expostos a babesiose nos primeiros meses da vida raramente apresentam sinais clínicos de doença e desenvolvem imunidade duradoura (MAHONEY et al., 1973).

Alguns pesquisadores argumentam que outros fatores além dos anticorpos colostrais, estariam envolvidos na resistência relacionada à idade, visto que os animais em crescimento excedem o período de proteção dos anticorpos maternos (BROWN et al., 2006). Por outro lado, foi referenciado que bezerros nascidos em regiões livres de *Babesia* spp. apresentam certo grau de resistência quando submetidos a desafios experimentais (GOFF et al. 1982)

Bock et al. (2004) afirmaram que a imunidade humoral tem pouco significado, uma vez que nas infecções por *Babesias* spp. os anticorpos têm a função de opsoninas para facilitar a fagocitose dos parasitas pelas células de defesa do organismo do hospedeiro.

Em Moçambique, os carrapatos estão amplamente distribuídos em todo o território nacional e a sua intensidade e diversidade varia em função de vários fatores, dentre eles, os agro-ecológicos, manejo higiênico-sanitário e tipo de raças de animais em criação (DIAS, 1960;1993; DE MATOS, 2008). As diferentes raças de bovinos se comportam de forma diferente perante as infestações por carrapatos. Enquanto raças taurinas são mais susceptíveis, as zebuínas apresentam certa tolerância (JONSSON et al., 2000).

Desta forma, certos cuidados são enfatizados em programas de repovoamento e melhoramento genético, pois quando não observados, as próximas gerações do rebanho podem apresentar maior susceptibilidade em relação a infestação por carrapatos e a infecção por agentes por eles transmitidos (BOCK et al., 1999b).

Diversos estudos demonstram que raças bovinas pertencentes ao grupo *Bos indicus* apresentam certa tolerância ao parasitismo por carrapatos, interferindo assim na intensidade de infecções por hemoparasitos (GUGLIELMONE, 1992; BOCK et al., 1999a; JONSSON et al., 2000).

As raças zebuínas, de uma forma geral, são tolerantes as infestações, contudo existem variações inter-raciais para este grupo de animais, que podem apresentar maior resistência dependendo do grau de rusticidade de cada raça bovina (UILENBERG, 1995; BOCK et al., 1997).

A resistência do *Bos indicus* à babesiose tem sido reportada em alguns estudos, e este fato pode estar relacionada à ineficiência na transmissão por parte do vetor, uma vez que os

animais se infectam, mas geralmente, não apresentam nenhuma sintomatologia clínica, e muitas larvas de carrapatos morrem antes de atingirem a maturidade (MATTIOLI et al., 1993; BOCK et al., 1997).

Estudos realizados por Bock et al. (1997, 1999b) na Austrália constataram que bovinos *Bos taurus* são mais susceptíveis à *B. bovis* quando comparado com bovinos *Bos indicus*.

Raças de bovinos autóctones que são originários de regiões endêmicas, muitas vezes apresentam certo grau de resistência natural a esses hemoparasitos e conseqüentemente as infecções não são tão graves como nas de raças exóticas (MATTIOLI et al., 1993).

Além da raça e a idade dos hospedeiros vertebrados, outro fator que pode interferir na taxa de infecção de *Babesia* spp. é o elevado grau de infestação por carrapatos nos animais, principalmente em áreas endêmicas (ZINTL et al., 2005). Este fato é reforçado quando se observa a relação entre o número de carrapatos ingurgitados e a taxa de inoculação dos hemoparasitos (FRIEDHOFF, 1988).

A estabilidade endêmica para a babesiose bovina e a presença dos carrapatos vetores em *Bos taurus* foi descrito na região da Oceania pelos australianos (MAHONEY; ROSSI, 1972). Esta estabilidade ocorre quando a inoculação de patógenos de *Babesia* spp. for suficiente para manter os níveis de anticorpos necessários para promoverem a resistência frente a re-infecções. Estes autores desenvolveram um modelo matemático que co-relaciona a taxa de infecção através de levantamentos sorológicos e a taxa de inoculação do patógeno nos animais como forma de categorizar as áreas em estabilidade ou instabilidade endêmica (McDONALD, 1950).

Norval et al. (1988), com base nesse modelo matemático definiram cinco diferentes situações epidemiológicas da babesiose bovina de acordo com resultados de prevalências sorológicas de animais positivos e a história de doença na área estudada, a saber: a) Estabilidade endêmica quando a soropositividade varia entre 81 a 100%; b) Próxima a estabilidade endêmica entre 61 a 80% de positividade; c) Instabilidade endêmica 21 a 60% de positividade; d) Situação mínima de doença 1 a 20% de positividade e e) Livre de doença quando não apresenta nenhuma positividade de infecção.

A situação de estabilidade endêmica é caracterizada normalmente pela constante transmissão de hemoprotozoários por carrapatos de forma que a primo-infecção nos bovinos ocorre durante os primeiros dias de vida, período esse em que os animais se encontram protegidos pela imunidade passiva recebida da mãe e sob forma de colostro materno tem ação da resistência inata. Nesse período verifica-se a ocorrência de muitos casos subclínicos e poucos casos clínicos da doença (GUGLIELMONE, 1995; COLEMAN, et al. 2001).

Mahoney et al. (1973) estimaram que quando 75% dos bovinos são infectados por *Babesia* spp. entre zero e nove meses de idade, a enfermidade ocorre em níveis baixos, caracterizando uma situação de estabilidade enzoótica. Entretanto, em áreas de maior controle de carrapatos ou em locais onde as condições de sobrevivência dos vetores são extremas, os animais não se infectam por períodos prolongados, devido a presença inconstante dos carrapatos vetores, assim não sendo suficiente para assegurar as taxas de inoculação de *Babesia* spp. em nível de garantir imunidade aos hospedeiros vertebrados (MAHONEY et al., 1981). Nestas condições existe uma grande possibilidade de ocorrência de surtos de babesiose bovina acompanhado por altas taxas de mortalidade dos animais susceptíveis (UILENERG, 1995).

Apesar da elevada patogenicidade, muitas vezes, a babesiose pode ocorrer de forma assintomática e os animais tendem a apresentar baixas parasitemias originando assim formas subclínicas da enfermidade (MAHONEY; MIRRE, 1977; PANDEY; MISHRA, 1978). A patologia da doença ocorre em função do excesso da produção de citocinas pró-inflamatórias e do efeito direto da destruição das hemácias pelos parasitas. Durante a infecção aguda, os

macrófagos são ativados pelos parasitas, produzindo as citocinas pró-inflamatória (BROWN; PALMER, 1999).

O resultado da infecção está relacionado com o tempo e a quantidade de produção dessas substâncias. O excesso de citocinas inflamatórias resulta em patologias graves levando a vasodilatação, hipotensão arterial, aumento da permeabilidade capilar, edema, colapso vascular, distúrbios na coagulação, lesão das células endoteliais e estase circulatória (WRIGHT et al., 1989).

Apesar do mecanismo de estase ser induzida na micro-circulação através da agregação de eritrócitos infectados em leitos capilares, as lesões mais deletéricas ocorrem a partir da aderência de eritrócitos parasitados em micro-capilares dos pulmões e do cérebro. Isso resulta em babesiose cerebral e na síndrome da angústia respiratória associada à infiltração de neutrófilos, a permeabilidade vascular e edema (BROWN; PALMER, 1999; BOCK et al., 2004). Anemia hemolítica progressiva se desenvolve durante o curso da infecção por *B. bovis*.

Os eritrócitos parasitados por *Babesia* spp. apresentam uma alteração na superfície da membrana citoplasmática que promovem a aderência da célula parasitada ao endotélio vascular e a outras hemácias não parasitadas (COOKE et al., 2005).

Os sinais clínicos associados com a infecção dependem da espécie do agente etiológico envolvido. No caso de *B. bovis*, a infecção leva a ocorrência de febre, inapetência, depressão, aumento da frequência respiratória, fraqueza e dificuldade locomotora, em alguns casos. A hemoglobinúria e hemoglobinemia estão frequentemente presente, podendo evoluir para a morte do animal. As aglomerações de eritrócitos que ocorrem nos capilares cerebrais interferem na circulação local, levando as alterações hemodinâmicas que culminam com danos tissulares. A babesiose cerebral ou nervosa é caracterizada por incoordenação motora, convulsão, opistótono, coma e morte (RODRIGUES et al., 2005).

Entretanto, nas infecções por *B. bigemina*, a patogenia é quase inteiramente relacionada à hemólise intravascular, distúrbios na coagulação sanguínea e cito-aderências. O estado hipotensivo é observado em *B. bovis*, mas não nas infecções por *B. bigemina* (BOCK et al., 2004).

Os registros de infecção intra-uterina por *Babesia* spp. em bovinos foram reportados com base na ocorrência de sintomatologia clínica em neonatos (BANNOR, 1976; DOWSETT et al., 1978; EGELI, 1996; YERUHAM et al., 2003). Com a utilização de técnicas de diagnóstico de alta sensibilidade, foi possível identificar que esse tipo de infecção não é seguido por sintomas clínicos e a sua relevância pode estar subestimada (MILLER et al., 1984; KUTTLER et al., 1988).

A fase aguda da doença é caracterizada pelos sinais de hemólise, derivada de uma parasitemia elevada (BÖSE et al., 1995). Nestas condições, o exame direto de esfregaços sanguíneos colhidos de ponta de orelha ou da cauda é o principal método diagnóstico empregado, pois além da praticidade, apresenta o baixo custo. Porém, é uma técnica de baixa sensibilidade, sendo este um fator limitante para a sua aplicação em estudos epidemiológicos envolvendo muitas amostras, em decorrência da incapacidade de se detectar animais cronicamente infectados e sem sinais clínicos (BÖSE et al., 1995; COSTA-JUNIOR et al., 2006).

2.3 *Anaplasma marginale*

2.3.1 Histórico

É uma bactéria intracelular obrigatória, encontrada exclusivamente dentro de vacúolos parasitóforos no citoplasma das células dos hospedeiros vertebrados, é pertencente ao Reino Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales. Os organismos desta ordem foram recentemente reorganizados e reclassificados em duas grandes

famílias: Anaplasmataceae e Rickettsiaceae, com base nas suas características biológicas e análise filogenética dos genes ribossomais 16S rRNA e *groELS* que codifica proteínas maiores de superfície (MSP) (DUMLER et al., 2001).

O gênero *Anaplasma* com esta nova reorganização, atualmente engloba os seguintes agentes patogênicos de ruminantes: *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma bovis* (*Ehrlichia bovis*) e *Anaplasma phagocytophilum*, que incluía três espécies, a saber *Ehrlichia phagocytophilum*, *Ehrlichia equi* e o agente etiológico de ehrlichiose granulocítica humana (HGE) (DUMLER et al., 2001; KOCAN et al., 2003).

Anaplasma centrale é caracterizado como sendo a espécie menos patogênica para ruminantes e por isso tem sido utilizada como vacina viva em bovinos em diversas regiões geográfica do mundo (DE LA FUENTE et al., 2005a).

Anaplasma marginale foi descrito pela primeira vez no Onderstepoort Veterinary Institute em Johannesburg na África do Sul, por Sir Arnold Theiler, no início do século XX.

Theiler (1910a, 1911) ao examinar esfregaços confeccionados a partir de amostras de sangue de bovinos importados da Inglaterra e corados com *Giemsa*, encontrou estruturas no interior das hemácias, que ele os denominou de "pontos marginais e centrais". O autor associou a presença destas estruturas com a ocorrência de uma doença específica nos animais examinados (THEILER, 1910a, 1911).

O termo *Anaplasma* foi sugerido em razão do patógeno na microscopia óptica aparentar-se desprovido de citoplasma, enquanto os termos *marginale* e *centrale* indicam a sua localização periférica e central dentro dos eritrócitos (THEILER, 1910a).

Theiler (1910b), identificou *A. marginale* o agente etiológico de uma enfermidade muito similar à febre do Texas, que era conhecida como febre biliar bovina, nos Estados Unidos da América.

Antes destas observações, Smith e Kilborne (1893) observaram que as granulações endoglobulares periféricas presente nos eritrócitos eram produtos da multiplicação de piroplasmas causadores da Febre do Texas, e assim, por engano afirmaram que os "pontos marginais" eram parte do ciclo de vida biológica da *Babesia bigemina* (KOCAN et al., 2010).

Entretanto, Theiler (1910a; 1911) conseguiu separar os dois agentes em infecções experimentais, demonstrando corretamente que babesiose e anaplasnose eram duas doenças bem distintas e que, muitas vezes, coexistiam no mesmo animal. Em consequência destas pesquisas a anaplasnose foi reconhecida mais tarde nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas como sendo um problema sério na Sanidade Animal (KOCAN et al., 2010).

As similaridades entre as patologias provocadas pelas infecções causadas por *Babesia* spp. e *A. marginale*, associadas ao fato das distribuições geográficas dos dois agentes ser quase que coincidente, representam um problema sanitário animal e de saúde pública. Desta forma, esta síndrome hemolítica, característica em ambas as doenças acabou ganhando denominações diferentes em várias partes do mundo, como "tristeza parasitária bovina", no Brasil, "tristezinha" na Argentina, "malária dos bovinos" ou "doença de coca-cola quente", em Moçambique e "redwater" e na África do Sul (THEILER, 1911).

Anaplasma marginale infecta eritrócitos de bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos, além de uma variedade de ruminantes silvestres (KUTLER, 1984). Em bovinos, duas espécies estão envolvidas na patogênese da doença, *A. marginale* considerada a espécie mais patogênica, e *A. centrale* que causa infecção moderada (RISTIC, 1968).

Os bovinos se infectam com *A. marginale* quando os corpos elementares são inoculados pelos carrapatos através das glândulas salivares durante o repasto sanguíneo nos hospedeiros vertebrados (KOCAN et al., 2004). No hospedeiro vertebrado ocorre a penetração do parasito nos eritrócitos que envolvem a invaginação da membrana citoplasmática formando o vacúolo parasitóforo. Já no interior do vacúolo, os corpos iniciais multiplicam-se por divisão binária originando vários corpúsculos (RISTIC, 1968).

Estes corpúsculos saem dos eritrócitos por um processo de invaginação sem romper a membrana das hemácias, iniciando um novo ciclo ao penetrar em novas células (RISTIC, 1968). Ao longo da infecção, o número de eritrócitos infectados aumenta de uma forma exponencial e os bovinos que se recuperam permanecem persistentemente infectados, servindo como reservatório para transmissão biológica ou mecânica desta rickettsia (KOCAN, et al., 1992b, ERIKS et al., 1993).

Os carrapatos se infectam durante o repasto sanguíneo em animais infectados e que estejam na fase aguda e com alta parasitemia. No hospedeiro invertebrado, *A. marginale* desenvolve-se dentro das membranas nos vacúolos parasitóforos, por divisão binária, formando grandes colônias que contêm centenas de organismos. Após o desenvolvimento nas células do intestino do carrapato e em muitos outros tecidos infectados, os esporozoítos se movimentam para as glândulas salivares (KOCAN et al., 1992a; KOCAN et al., 1992b; GE et al., 1996).

Anaplasmosse bovina apresenta uma distribuição cosmopolita estando presente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas em todas as regiões do mundo nos cinco continentes (GUGLIELMONE, 1995; KOCAN et al., 2003; 2004). Contudo, tanto a frequência quanto a incidência de infecções por essa rickettsia são mais elevadas em regiões onde o carrapato vetor é endêmico e se desenvolve melhor (FUTSE et al., 2003).

A infecção na sua fase aguda os animais acometidos se caracteriza por apatia, febre, anemia, fraqueza generalizada, mucosas pálidas, perda de peso (AJAYI et al., 1978; GOODGER; CARPENTER, 1979), aborto (CORREA et al., 1978), decréscimo na produção diária de leite, altas taxas de morbidade e mortalidade (KOCAN et al., 2003).

A transmissão de *A. marginale* tem sido motivo de muita controversia entre diversos pesquisadores, pois ainda existem algumas dúvidas em relação ao mecanismo e à importância epidemiológica de cada um dos diferentes mecanismos de transmissão proposto e dos respectivos vetores (GUGLIELMONE, 1995).

A transmissão biológica da anaplasmosse foi demonstrada experimentalmente em 20 espécies de carrapatos, incluindo *R. microplus*, os gêneros *Hyalomma* spp., *Dermacentor* spp. e *Ixodes* spp. (HAWKINS et al., 1982; UILENBERG, 1995; JONGEJAN; UILENBERG, 2004; KOCAN et al., 2004), mas a relevância de cada uma dessas espécies de carrapatos na transmissão sob condições naturais, ainda não está bem esclarecida (GONÇALVES-RUIZ et al., 2002).

Essa transmissão pode ocorrer de forma trans-estadial, ou seja, o carrapato se infecta em um estágio do ciclo de vida, e ao realizar a muda de estágio seguinte, transmite o agente etiológico para o próximo hospedeiro (KOCAN et al., 2003). Pode ocorrer também a transmissão intra-estadial, ou seja, o carrapato transmite o agente etiológico em um mesmo estágio do ciclo biológico. Este tipo de transmissão é principalmente efetuado por carrapatos machos, em relação à infecção por *A. marginale* (KOCAN et al., 2004).

A transmissão transovariana no carrapato *R. microplus* tem sido contestada por diversos pesquisadores (GONÇALVES-RUIZ et al., 2002).

No entanto, através da técnica da nested (nPCR) foi possível detectar a presença de fragmento de DNA de *A. marginale* na progênie de fêmeas alimentadas em bezerros portadores assintomáticos e em larvas coletadas diretamente na pastagem (SHIMADA et al., 2004; MOURA et al., 2003).

Os dados disponíveis até ao momento, sobre a transmissão de *A. marginale* para ovos e larvas de *R. microplus*, sugerem que este pode ser um evento, se não pouco frequente ou irregular na natureza, como sugerido por Kocan et al. (2004).

Diferentemente, das espécies de *Babesia* spp., ainda não foi comprovada a transmissão de *A. marginale* por larvas de *R. microplus* que tenham sido infectadas por esta via (KOCAN et al., 2004).

Sabe-se que *R. microplus* é um carrapato monoxeno e realiza todas as suas mudas sobre um único hospedeiro vertebrado. Desta forma, admite-se que a transmissão trans-estadial de larvas para ninfas e de ninfas para adultos possa ocorrer com certa frequência na mudança de hospedeiro ao se deslocarem do local de fixação do ínstar anterior e reiniciar a alimentação do novo ínstar (BÜSCHER, 1988; HOMER et al., 2000). Destaca-se nesse sentido a possibilidade de bezerros lactantes se infectarem com carrapatos proveniente de suas mães (MELO et al., 2001).

A transmissão intra-estadial de *A. marginale*, realizada por carrapatos machos, pode ser um importante mecanismo de transmissão no caso de carrapatos de um único hospedeiro, devido a sua longevidade e capacidade de locomoção (POTGIETER et al., 1981). A transmissão trans-estadial e a intra-estadial é mais efetiva e eficiente no sistema de criação intensiva devido a maior interação física e frequente entre os animais, o que facilitaria a transferência dos carrapatos de um animal para outro (AGUIRRE et al., 1994). Da mesma forma, o nível de parasitemia nos bovinos afeta a proporção de carrapatos infectados e também a competência de infecção dos vetores.

Existem até ao momento questões não elucidadas sobre aspectos da transmissão biológica deste agente etiológico, pois observou-se que, alguns isolados de *A. marginale* não infectam carrapatos (KOCAN et al., 2002; 2004).

A presença de isolados de *A. marginale* não transmissíveis por carrapatos põe em evidência outras possíveis formas de transmissão desta rickettsia que assumiriam assim um papel de destaque na epidemiologia da anaplasmose bovina (DE LA FUENTE et al., 2005b).

A transmissão mecânica pode ser efetuada por artrópodes hematófagos e por materiais perfuro-cortante que são utilizados em cirurgias e vacinações, incluindo agulhas, serra de descorna, alicates, pinça de tatuagem, aplicadores de brincos, aparelhos e instrumentos de castração contaminados por sangue de animais infetados (KOCAN et al., 2005). Os dípteros hematófagos são vetores mecânicos, e incluem diferentes espécies de tabanídeos, *Stomoxys calcitrans* e algumas espécies de mosquitos como *Culex* e *Aedes* (SCOLES et al., 2005).

Os dados experimentais sobre a eficiência e o impacto da transmissão mediada por insetos hematófagos são escassos. De acordo com Scoles et al. (2005), esse tipo de transmissão depende do nível de parasitemia no momento do repasto sanguíneo do artrópode e dessa forma se restringe à fase aguda da infecção dos bovinos. Por outro lado, essa forma de transmissão seria a mais importante para a disseminação de *A. marginale* em regiões onde não ocorre o carrapato vetor, em regiões em que os isolados geográficos não infectam os carrapatos ou ainda onde os carrapatos foram já erradicados (KOCAN et al., 2003).

A via transplacentária tem sido referenciada como outra forma de transmissão de *A. marginale* cuja importância epidemiológica carece de melhor esclarecimento científico. A maioria dos relatos de transmissão congênita refere-se a casos em que bezerros recém-nascidos desenvolveram uma doença hemolítica (PAINE; MILLER, 1977, NORTON et al., 1983).

Existe controvérsia quanto ao significado epidemiológico da transmissão congênita e dos animais nascidos congenitamente infectados, pois os dados disponíveis não apresentam uma clara definição sobre o assunto, podendo porém ter uma importância nas infecções fetais que estaria relacionada com a mortalidade neonatal.

Na África do Sul (POTGIETER; VAN RESBURG, 1987) constataram a ocorrência de infecção intrauterina em 15,6% dos 77 bezerros examinados de um rebanho de uma determinada região daquele país. Com base neste resultado, Kocan et al. (2003) consideraram

que a transmissão congênita de *A. marginale* tem importância epidemiológica em determinadas regiões tropicais e subtropicais do planeta.

Em relação a patologia da infecção, o número de eritrócitos parasitados aumenta de forma exponencial quando ocorre a fagocitose por células do sistema fagocítico mononuclear, resultando em anemia e icterícia, sem que ocorra hemoglobinememia e hemoglobinúria (DE LA FUENTE et al., 2001a). Além da alteração eritrocitária, foi demonstrado experimentalmente que após o segundo dia da infecção por *A. marginale* se instala um quadro de leucocitose que desaparece após cerca de trinta dias da infecção. O quadro clínico ainda é caracterizado por febre, apatia e perda de peso, podendo levar os animais a óbito (ALFONSO et al., 1996).

Os bovinos que sobreviverem à fase inicial da infecção tornam-se portadores crônicos por toda a vida, ou seja, permanecem infectados, porém com baixos níveis de parasitemia, o que geralmente não é suficiente para desencadear os sinais clínicos típicos da doença (PALMER et al., 2000). Embora essa imunidade ou infecção seja duradoura e impeça novas infecções, os bovinos persistentemente infectados, permanecem como fonte de infecção para os artrópodes vetores, assim como uma fonte de contaminação dos instrumentos perfurocortantes, como instrumentos cirúrgicos e agulhas. Este último instrumento apresenta-se relevante na disseminação do agente etiológico da doença durante as campanhas de vacinações dos animais, pois favorece a transmissão iatrogênica da rickétsia nos rebanhos (GUGLIELMONE, 1995).

A resposta imunológica dos bovinos infectados por *A. marginale* envolve tanto mecanismos de origem humoral quanto celular, tendo o baço importante função no desenvolvimento e manutenção dessa imunidade (MEHLITZ; EHRET, 1974). A remoção do baço deixa os animais totalmente susceptíveis à infecção e a anaplasose em bezerros esplenectomizados é geralmente mais grave do que a observada em outras classes de bovinos (KOCAN et al., 2004). A esplenectomia prejudica tanto a defesa imune celular, quanto a formação de anticorpos IgM, que aparecem logo após a infecção e apresentam atividade de fixação de complemento (WRIGHT, 1973).

Alguns fatores de risco relacionados principalmente com idade, imunidade, taxa de inoculação de *A. marginale* pelos vetores, clima, manejo e raça têm sido apontados na epidemiologia da anaplasose bovina (RISTIC, 1968; WANDURAGALA; RISTIC, 1993). Em áreas endêmicas, com elevadas populações de vetores, a primo-infecção por *A. marginale* ocorre em animais jovens, nos primeiros dias de vida.

Numa população de animais susceptíveis, principalmente no caso do comércio regional ou internacional de bovinos, oriundos de áreas de instabilidade enzoótica para regiões de estabilidade enzoótica, a mortalidade em decorrência da anaplasose é maior em animais adultos do que em animais jovens com menos de nove meses de idade (MARTINS et al., 2008; TEMBUE et al., 2001b).

Este aspecto foi observado em Moçambique, durante a implementação do programa de repovoamento pecuário nacional. Vários animais, oriundos de áreas de instabilidade enzoótica foram alocados no país em áreas de estabilidade enzoótica e com deficiente sistema de controle de ectoparasitos, causando uma mortalidade superior a 50% (MARTINS et al., 2008).

Os animais jovens são mais resistentes à doença por *A. marginale* do que os mais velhos, pois quando infectados são menos propensos a desenvolver a doença clínica (KOCAN et al., 2004). Os bezerros nascidos em regiões endêmicas, ao se infectarem nos primeiros dias de vida, apresentam ainda uma elevada imunidade passiva em decorrência da ação de anticorpos maternos e da imunidade celular (ROSS; LOHR, 1970).

Em virtude dessas características epidemiológicas, o conceito de estabilidade e instabilidade enzoótica, proposto e aplicado por Mahoney et al. (1973) no estudo da babesiose bovina é também aplicável no estudo da anaplasose bovina (GUGLIELMONE, 1995).

A tolerância de uma determinada faixa etária nas infecções por *A. marginale* é reconhecida de forma consensual à semelhança do que se observou na babesiose bovina, mas já a susceptibilidade com relação à raça é contestável (OTIM et al., 1980; WILSON et al., 1980).

Em estudos realizados sob condições naturais e experimentais na Austrália (BOCK et al., 1997; 1999b) foram detectadas diferenças muito discretas em favor dos *Bos indicus*. Novilhas zebuínas puras quando comparadas com as novilhas taurinas manifestaram a infecção por *A. marginale* de forma ligeiramente mais branda (OTIM et al., 1980; WILSON et al., 1980; PARKER et al., 1985).

Estudos experimentais realizados por Otim et al. (1980); Wilson et al. (1980), Parker et al. (1985) e Bock et al. (1997) com novilhos taurinos, zebuínos e mestiços, frente a infecção por *A. marginale*, demonstraram que independentemente da raça e do grau de sangue existe risco de desenvolvimento de doença.

Não existe nenhum sinal clínico clássico e patognomônico frente as infecções por *A. marginale*, quando comparado clinicamente aos sinais clínicos da babesiose, tornando necessário o apoio laboratorial (TRUEBLOOD et al., 1991).

Em relação ao vetor do agente etiológico da doença, a maioria das pesquisas em que as técnicas de amplificação de fragmento de DNA foram empregadas para investigar as relações entre os vetores e *A. marginale* contemplaram espécies de carrapatos que não ocorrem em várias partes do mundo (DE LA FUENTE et al., 2001b, 2005a; SCOLES et al., 2005).

No que se refere ao carrapato *R. microplus*, essas pesquisas possibilitaram a constatação de que esse artrópode retém sua capacidade vetorial em relação a isolados que ocorrem em áreas livres dessa espécie (FUTSE et al., 2003).

Nas últimas décadas, a técnica baseada em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) tem substituído as demais técnicas sorológicas em função das vantagens que apresentam (BARROS et al., 2005). Além de possibilitar a análise de um grande número de amostras, trata-se de uma metodologia que elimina erros da avaliação subjetiva do técnico pela possibilidade de leitura automatizada (MADRUGA et al., 2000; SOARES, 2001).

Em decorrência das várias vantagens das técnicas imunoenzimáticas de diagnóstico e da característica de possibilitar a análise de um grande número de amostras em um curto intervalo de tempo, essas técnicas têm sido as mais utilizadas nos estudos epidemiológicos da anaplasose bovina (MADRUGA et al., 2000; BARROS et al., 2005).

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

Os avanços obtidos no campo da biologia molecular tornaram possível o desenvolvimento de novas metodologias para diagnóstico de parasitas baseadas na detecção de DNA do parasito que, ao contrário de substâncias como proteínas, permanece inalterado em todos os estágios do ciclo biológico do parasita (BARKER, 1990).

Os primeiros avanços científicos obtidos com a aplicação das provas baseadas na detecção de DNA de *A. marginale* foram revisados por diversos autores (BARBET, 1995; FIGUEROA; BUENING, 1995; STILLER; COAN, 1995). Nestas publicações os autores realçam o progresso da técnica de biologia molecular e as descobertas subsequentes que propiciaram em relação a essa rickettsia.

Atualmente, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), desenvolvida por Mullis; Faloona (1987), tem sido a técnica molecular mais utilizada na investigação deste e de outros parasitas. Através da PCR, uma determinada região do genoma de qualquer organismo pode ser multiplicada em milhões de cópias, possibilitando o diagnóstico específico com elevada precisão.

No que se refere aos hospedeiros vertebrados, a aplicação das técnicas de PCR no diagnóstico das infecções por *A. marginale* tem como principal vantagem a possibilidade de identificar animais soronegativos infectados, como por exemplo, animais em fases iniciais da infecção ou que foram infectados congenitamente (COSSÍO-BAYÚGAR et al., 1997) e distinguir animais soropositivos infectados de animais vacinados (GALE et al., 1996).

Em Moçambique, não existem relatos sobre a presença de DNA de *A. marginale* em bovinos infectados com essa rickettsia. A anaplasmose bovina isoladamente ou em associação com outras doenças transmitidas por carrapatos tem sido apontada como uma das principais causas de morbidade e mortalidade de bezerros e que a sua importância econômica varia de região para região, dependendo principalmente das condições edáfico-climáticas para a sobrevivência e multiplicação de vetores de doença e da adoção de práticas de manejo higiênico sanitário (TEMBUE et al., 2011b).

Recentemente, estudos soroepidemiológicos realizados por Tembue et al. (2011b) reportaram percentuais de positividade para anaplasmose bovina de 76,6% nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique.

2.4 Gênero *Borrelia*

2.4.1 Histórico

O gênero *Borrelia* Swellengrebel 1907 é constituído por bactérias gram negativas, microaerófilas, móveis, pertencentes à ordem Spirochaetales, família Spirochaetaceae. As espécies pertencentes a este gênero possuem um formato helicoidal que pode variar de 3 a 10 espiras (CALLOW, 1967), medindo de 4 a 30µm e se reproduzem por fissão binária transversal (AUSTIN, 1993).

Este organismo tem o protoplasma cilíndrico envolto pela membrana celular, da qual partem flagelos e possui externamente outra membrana contendo diversas proteínas de superfície, sem a presença de túbulos citoplasmáticos (NEITZ, 1956; KRIEG; HOLT, 1984; BARBOUR; HAYES, 1986).

Estas bactérias distinguem-se morfologicamente dos demais gêneros desta família, por serem maiores, possuem maior número de flagelos periplasmáticos (15 a 20) e menor número de espiras (PFISTER et al., 1994; QUINN et al., 1994). Entretanto, dentro de uma única espécie pode ocorrer pleomorfismo (BENNETT, 1995). Coram-se facilmente pelos corantes derivados da anilina e do Romanovski, crescem à temperatura de 33°C em meios artificiais e podem ser visualizadas através de microscopia de campo escuro, de contraste de fase ou ainda em tecidos, quando forem corados à base de prata (BARBOUR; HAYES 1986; QUINN et al., 1994).

A primeira observação de uma espiroqueta foi feita por Leeuwenhoek, em 1681, a partir de amostras obtidas da mucosa bucal e do trato gastro-intestinal de ser humano. No entanto, sua importância só foi reconhecida em 1863, após Obermeier observá-la no sangue de pacientes com febre recorrente (PAVLOVSKY, 1965).

Este grupo de micro-organismos teve a sua classificação incerta durante muito tempo, sem nenhuma definição clara e foram classificados como sendo algas, bactérias e protozoários. Permaneceram classificados durante anos como pertencentes ao Filo Protozoa, Classe Spirochetes (BRUMPT, 1927).

As espécies do gênero *Borrelia* na sua maioria são parasitos sanguíneos de animais e seres humanos (FELSENFELD, 1965; BARBOUR; HAYES, 1986), embora exerçam uma relação simbiótica com os carrapatos, principalmente, os argasídeos (HOOGSTRAAL, 1979). Estes parasitos determinam cinco grupos de enfermidades distintas, dentre elas estão: a febre recorrente humana, causada pela *B. recurrentis*, considerada a enfermidade mais antiga causada por *Borrelia*, com registros de sua ocorrência no período anterior do início das civilizações egípcias no norte da África, e responsável por milhões de óbitos (BRUMPT, 1927; PAVLOVSKY, 1965, BARBOUR; HAYES, 1986); a espiroquetose bovina, causada por *B. theileri* Laveran 1903, que determina um quadro anemiantes em ruminantes e equinos, e é considerada pouco patogênica (QUINN et al., 1994); Aborto epizootico bovino, uma enfermidade que acometem bovinos tendo como agente etiológico *B. coriaceae* (BREITSCHWERDT et al., 1994, ZINGG; LEFEBVRE, 1994).

As diferentes espécies de espiroquetas dentro do gênero *Borrelia* foram classificadas de acordo com a sua especificidade em relação ao triângulo parasita-vetor-hospedeiro (HOOGSTRAAL, 1985), porém, existem espiroquetas que não são transmitidas por uma única espécie de vetor, assim como, não infectam uma única espécie de hospedeiro vertebrado. Desta forma, atualmente sua identificação ocorre pela associação entre estudos biológicos, bioquímicos e moleculares (BARBOUR; HAYES, 1986; MARCONI et al., 1995; SILVA; FIKRIG, 1997).

Dentre os membros da ordem Spirochaetales, apenas *Borrelia* spp. são transmitidas por artrópodes hematófagos, principalmente por carrapatos e, em raros casos, por tabanídeos, culicídeos e sifonápteros (MAGNARELLI et al., 1986; 1987).

A infecção por espiroquetas pode também ocorrer pelo contato com a urina de animais infectados, por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e de tecidos, além da forma congênita (HYDE et al., 1989; DORWARD et al., 1991; GUSTAFSON et al., 1993).

Burgdorfer et al. (1982) observaram espiroquetas em lâminas confeccionadas a partir de preparados de intestino de carrapatos da espécie *Ixodes dammini* de uma área endêmica para borreliose de Lyme com consequente isolamento da espiroqueta em meio Barbour Stoenner e Kelly (BSK). Desde então, diferentes espécies de carrapatos tem sido incriminadas na transmissão de espiroquetas em animais e seres humanos.

Entre os argasídeos encontram-se diversas espécies de *Ornithodoros* spp. e *Argas* spp. transmitindo *Borrelia* spp. principalmente via líquido coxal. Entre os ixodídeos dos gêneros *Ixodes* spp., *Amblyomma* spp., e *Rhipicephalus* spp. a transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo por meio da inoculação dos micro-organismos juntamente com a saliva infectada (BALASHOV, 1972; HOOGSTRAAL, 1985; BURGDORFER et al., 1989).

Em relação aos carrapatos ixodídeos, a transmissão de *Borrelia* spp. ocorre principalmente durante a fase de ninfa, tendo este estágio maior importância epidemiológica na transmissão, manutenção e dispersão da espiroqueta.

No entanto, todos os estágios podem promover a sua transmissão. Estudos experimentais demonstraram que para esses vetores é necessário um tempo mínimo de fixação no hospedeiro vertebrado superior a 48 horas para que ocorra a transmissão (BENACH et al., 1987; LANE; BURGDORFER, 1987; LANE; MANWEILER, 1988).

A infecção do carrapato ocorre durante a ingestão de sangue em um hospedeiro vertebrado contendo as espiroquetas por transmissão transovariana e trans-estadial (SMITH et al., 1978; HOOGSTRAAL, 1985).

A transmissão transovariana, porém, não ocorre em todas as espécies de carrapatos (BURGDORFER et al., 1989). Após a infecção do carrapato, as espiroquetas iniciam uma fase de multiplicação em nível intestinal e, posteriormente, migram para a hemocele disseminando-se pelos órgãos, chegando à glândula salivar (BENACH et al., 1987; RIBEIRO et al., 1987).

As diferentes espécies de *Borrelia* spp. desenvolvem-se em simbiose com seus vetores, porém seu crescimento e multiplicação no interior do carrapato são afetados por processos fisiológicos do ciclo vital deste artrópode e muitas espiroquetas podem morrer após a mudança de estágio do carrapato. Da mesma forma, o carrapato também pode morrer por um número excessivo de espiroquetas que podem invadir seus órgãos e causar lesões severas ou tornar-se infértil por danos durante a formação de seus ovos (PIESMAN et al., 1990).

As doenças transmitidas por artrópodes são as que mais acometem os animais e seres humanos, principalmente, pelo fato da habilidade de dispersão dos patógenos, além do envolvimento mecânico ou biológico do artrópode (BRUMPT, 1927; SCHWAN, 1996).

Os carrapatos são importantes no ciclo biológico das borrelias. Hoogstraal (1985) reportou que elas desenvolvem-se como simbiontes nos artrópodes e atuam como parasitas nos animais e no homem.

Restrepo et al. (1994), Schwan (1996) e Silva; Fikrig. (1997), reportaram que sucessivas infecções por *Borrelia* sem o envolvimento do carrapato, diminuem sua patogenicidade, podendo tornar-se não patogênica. Estes autores verificaram que existe certa interdependência bioquímica entre as espiroquetas e o vetor, principalmente ao nível de trato gastro-intestinal do artrópode, tanto no aspecto de desenvolvimento, quanto de multiplicação da *Borrelia*. Este fenômeno, bem como a ocorrência da atividade química das espiroquetas em determinados compartimentos do trato digestivo do carrapato estão relacionados à ativação de genes, presentes em *Borrelia*, para determinadas fases do ciclo biológico (BARBOUR, 1990; FIKRIG et al., 1992, RESTREPO et al., 1994).

A variação antigênica das borrelias é similar ao que ocorre com outros parasitas, como *Babesia*, *Leishmania* e *Trypanosoma*, que possuem mecanismos de escapes do sistema imune de seus hospedeiros, determinados geneticamente, quando as condições do meio ambiente em que se encontram, tornam-se desfavoráveis ao seu desenvolvimento (BURMAN et al., 1990, VAN DER PLOEG et al., 1992, SILVA; FIKRIG 1997).

A temperatura ambiente em que vivem os carrapatos é determinante para que ocorra a transmissão de *Borrelia*. A temperatura elevada é deletérica para a maioria dos artrópodes incluindo muitas espécies de espiroquetas, dada sua influência nos processos metabólicos, no balanço hídrico e no processo digestivo do vetor (HOOGSTRAAL, 1985; SHIH et al., 1995a).

O crescimento e multiplicação da *Borrelia* no carrapato são afetados por processos fisiológicos durante o ciclo biológico no artrópode. Muitas espiroquetas podem morrer logo após a mudança de estágio do vetor, como também o carrapato pode morrer por um número excessivo de espiroquetas que podem lesar seus órgãos (ZPIESMAN et al., 1990; SCHWAN, 1996).

Em relação ao modo de transmissão das espécies de *Borrelia*, destacam-se as formas transovariana e trans-estadial. Nas espécies transmitidas pelos argasídeos ocorrem principalmente na forma transovariana, o que é bem caracterizado na espécie da *Borrelia anserina*, que acomete aves, embora haja também transmissão horizontal, com as borrelias do grupo da febre recorrente para *Ornithodoros* (HOOGSTRAAL, 1979, 1985, BARBOUR; HAYES, 1986). Contudo, nos argasídeos, o modo de transmissão está intimamente relacionado à cepa do carrapato, à região geográfica, à espécie de *Borrelia* envolvida isoladamente ou ainda em associação com hemoparasitos (HOOGSTRAAL, 1985).

Para os carrapatos da subordem ixodídeo, a transmissão pode ocorrer de ambos os modos (SMITH et al., 1978; RANDOLPH et al., 1996). A explicação do fenômeno foi bem compreendida em estudos realizados com *Borrelia* de Lyme, como modelo experimental usando as espécies de carrapatos do gênero *Ixodes* (OLIVER Jr et al., 1993) e demais espécies de *Ixodes* vetores de *Borrelia burgdorferi* (BURGDORFER et al., 1985, ANDERSON et al.,

1987; EWING et al., 1994) e quando da sua associação com babesiose e ehrlichiose (SPIELMAN et al., 1979, 1985; PIESMAN et al., 1986).

No grupo dos argasídeos todos os estágios têm habilidade para transmitir *Borrelia*, enquanto entre os ixodídeos, o estágio de ninfa parece ter maior importância na cadeia epidemiológica de transmissão, manutenção e dispersão das espiroquetas, estando estes processos biológicos relacionados ao hospedeiro vertebrado no qual o carrapato realiza o seu repasto sanguíneo (BENACH et al., 1987; LANE; BURGDORFER, 1987; TELFORD; SPIELMAN, 1989).

Em estudos experimentais, foi possível verificar que o tempo de fixação no hospedeiro vertebrado é relevante à eficiência na transmissão do patógeno. Nos ixodídeos foi demonstrado que são necessários pelo menos mais de 48 horas para uma transmissão efetiva do patógeno (PIESMAN et al., 1987; FALCO; FISH, 1989; FALCO et al., 1995).

Entretanto, para os argasídeos foi verificado que o tempo de fixação não tem importância (DODGE, 1973; SMITH et al., 1985), pelo fato de neste grupo de ectoparasitas ocorrerem à transmissão através da saliva durante o repasto sanguíneo (BALASHOV, 1972; SONESHINE, 1991).

As espécies de argasídeos demonstraram ter potencial para transmissão de quase todas as borrelias (HOOGSTRAAL, 1985; BARBOUR; HAYES, 1986), enquanto nas espécies do gênero ixodídeos o processo de transmissão é mais restrito. Das cinco enfermidades de borreliososes conhecidas, todas são transmitidas por carrapatos, sendo cada relacionada a uma espécie de espiroqueta e os respectivos artrópodes vetores.

A relação entre *Borrelia* e o carrapato é tão estreita, que a espécie pode ser isolada e identificada com o auxílio do xenodiagnóstico (APPEL et al., 1993). No momento da transmissão, a saliva do carrapato vetor exerce ainda ações no sistema imunológico do hospedeiro, como o bloqueio de células fagocitárias e inflamatórias, facilitando a penetração e disseminação do patógeno (RIBEIRO et al., 1987).

Embora o principal modo de transmissão das espiroquetas seja por carrapatos, ela pode ocorrer ainda pelo contato com a urina de roedores infectados, por transfusão sanguínea, transplante de tecidos, por contato ou congenitamente em animais (BURGESS et al., 1986; KARCH et al., 1994).

A descrição de espiroquetas de borreliose na região da África Austral foi feita por Sir Arnold Theiler em 1902, na África do Sul, durante o exame de esfregaços confeccionados a partir de sangue de bovinos que haviam abortados de causas desconhecidas. O patógeno identificado foi descrito como *Spirochaeta theileri* e mais tarde renomeado como *Borrelia theileri* Laveran 1903 (CALLOW, 1967).

Três décadas depois esta espécie foi observada em várias espécies de animais tais como: bovinos, ovinos, equinos, cervídeos, ímpala e outros ruminantes silvestres (NEITZ, 1935; IRVIN et al., 1973; MATTON; MELCKEBEKE, 1990) e incriminada como causa de anemia moderada nestes animais, entretanto quando associada a outros hemoparasitas, pode produzir uma doença clínica grave (IRVIN et al., 1973). Contudo, os mamíferos, de uma forma geral, são hospedeiros acidentais que podem servir como portadores para a preservação e disseminação do agente etiológico (MARTINS et al., 1996).

A borreliose em ruminantes tem uma distribuição cosmopolita, ocorrendo em todas as regiões do mundo (NEITZ, 1956; VIVAS et al., 1996). Os carrapatos vetores são do gênero *Rhipicephalus* e as espécies *R. evertsi evertsi* e *R. appendiculatus* (SMITH et al., 1985), podendo ser esta espiroqueta patogênica para o carrapato, como reportado para *R. microplus* (SMITH et al., 1978; VIVAS et al., 1996).

As espiroquetas são normalmente consideradas não patogênicas, apesar de existirem relatos da ocorrência de doença clínica. Durante a fase de parasitemia, os bovinos infectados por *B. theileri* podem exibir suave elevação de temperatura, letargia, anemia e hematúria

(CALLOW, 1967; SMITH et al., 1978). Estes sinais clínicos caracterizam uma síndrome parecida com a de babesiose, dificultando deste modo o diagnóstico clínico feito em nível de campo, mas confirmada por exame de esfregaços sanguíneos em laboratório (CALLOW, 1967).

Rogers et al. (1999) observaram espiroquetemia em bovinos com elevada temperatura e letargia, mas anemia e hematúria não foram observadas.

Sharma et al. (2000) no Botswana, na região da África Austral suspeitaram de borreliose em dois bovinos adultos de um rebanho com febre, linfonodos pré-escapulares e parótideos infartados, anemia, hemoglobinúria, inapetência e diarreia. Um dos animais veio a óbito e exame do esfregaço sanguíneo apresentou grande quantidade de *B. theileri* e poucos outros hemoparasitos como *B. bovis* e *Theileria parva*. Alguns animais se recuperaram após o tratamento com antibióticos de longa duração.

B. theileri é detectável em esfregaços sanguíneos, a partir 2 a 4 semanas após o repasto sanguíneo de carrapatos infectados, mas em poucos dias desaparecem (SMITH et al., 1978).

Nas infecções subsequentes podem ocorrer novos picos de parasitemia, mas sem sinais clínicos de doença (CALLOW, 1967). Segundo Smith et al. (1978) os curtos períodos de febre coincidem com a presença de espiroquetas observáveis em esfregaço sanguíneo.

Embora a infecção por *B. theileri*, na maioria das vezes, se apresente de forma assintomática em bovinos, esta espiroqueta permanece importante por ser bastante disseminada.

A distribuição geográfica de *Borrelia* spp. em bovinos está diretamente relacionada à distribuição de seus vetores. *B. theileri* tem sido reportada quase que exclusivamente em regiões tropicais e subtropicais e está diretamente relacionada com a distribuição de carrapatos vetores tais como: *Rhipicephalus microplus*, *R. annulatus*, *R. decoloratus*, *R. australis*, *R. evertsi*, *Ixodes ricinus* e *Haemaphysalis cinnabarina punctata* na Oceânia (CALLOW, 1967), na África (MATTON; MELCKEBEKE, 1990; SHARMA et al., 2000; TREES, 1978), nas Américas (HADANI et al., 1985; VIVAS et al., 1996; MARTINS et al., 1996) e na Europa (SHILLHORN VAN VEEN; LEYENDEKKERS, 1971; SMITH; ROGERS, 1998; UILENBERG et al., 1988).

Os aspectos biológicos observados em *R. microplus*, sugerem que a replicação de *B. theileri* pode ocorrer em maior intensidade no vetor do que nos bovinos (SMITH et al., 1985; SMITH; ROGERS, 1998).

Segundo Smith et al. (1978) ovários e a hemolinfa do carrapato vetor são os locais preferenciais de *B. theileri*, com extensiva multiplicação ocorrendo nos hemócitos, sendo que as glândulas salivares são os primeiros órgãos a serem invadidos pelas espiroquetas após o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado.

Alguns autores sugerem que *B. theileri* parece não ser patogênica para o carrapato (CALLOW, 1967; SMITH et al., 1978). Somente os estágios de ninfa e adulto são capazes de transmitir as espiroquetas aos bovinos (CALLOW, 1967), apesar de ocorrer infecção transovariana e espiroquetas serem detectadas 72 horas após larvas se alimentarem em hospedeiros infectados. Não está bem claro porque é que as larvas de *R. microplus* são incapazes de transmitir *B. theileri* aos bovinos. Acredita-se que poucas espiroquetas conseguem invadir as glândulas salivares após infecção no estágio larval (SMITH et al., 1978; MARTINS et al., 1996).

A borreliose bovina causada por *B. theileri* pode ocorrer associada a outras hemoparasitoses como a babesiose, anaplasmose, theileriose e ehrlichiose agravando ainda o quadro clínico e hematológico do animal acometido, especialmente, em animais esplenectomizados (SMITH et al., 1985; UILENBERG, 1986; MATTON; MELCKEBEKE, 1990).

No entanto, Matton e Melckkebeke (1990) reportaram que a espiroqueta deixa de ser observáveis em esfregaços sanguíneos quando da presença de *B. bigemina* e reapareceram quando esta infecção for controlada. Conhecer as implicações destas interações entre estes agentes etiológicos é fundamental para o melhor entendimento do mecanismo patogênico destas enfermidades, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais onde carrapato *R. microplus* é o principal vetor de *B. bigemina*, *B. bovis* e de *A. marginale*, assim como de *B. theileri* (NEITZ, 1956; SMITH et al., 1978).

Como ocorre com *B. burgdorferi*, a espécie *B. coriacea* tem sido detectada principalmente em regiões de clima temperado e tem como vetor o carrapato *Ornithodirus coriaceus* (CALLOW, 1967). A infecção por *B. coriacea* tem sido associada com o aborto epizootico bovino (JOHNSON et al., 1987), podendo também infectar cervídeos (ZINGG; LEFEBVRE, 1994).

A distinção entre as três espécies de espiroquetas que acometem ruminantes (*B. theileri*, *B. burgdorferi* e *B. coriacea*) é importante uma vez que a distribuição geográfica dos hospedeiros invertebrados e vertebrados é coincidente e a caracterização de espécies potencialmente zoonóticas, incluindo *B. theileri*, é de grande relevância para a saúde pública e animal (SMITH; ROGERS, 1998).

As aves silvestres têm papel relevante na epidemiologia da borreliose (ANDERSON et al., 1986; ANDERSON, 1988), pois estas servem de reservatórios para *B. burgdorferi* (OLSEN et al., 1995), além de serem muitas vezes migratórias acabarem por transportar carrapatos infectados de uma região geográfica para outra (SCHOELER; LANE, 1993).

Não há registros de doença nas aves ocasionada por esta espiroqueta. Provavelmente a elevada temperatura corporal seja deletérica ou haja incompatibilidade imunológica da ave com o parasita, bloqueando a ação patogênica da *Borrelia* nas aves (MANWEILER et al., 1990; NICHOLS; CALLISTER, 1996).

O envolvimento das aves silvestres na epidemiologia da borreliose está registrado na América do Norte (MANWEILER et al., 1990; STAFFORD et al., 1995; NICHOLS; CALLISTER, 1996), na Europa (MATUSCHKA; SPIELMAN 1992; RANDOLPH; CRAINE, 1995) e na Ásia (MIYAMOTO et al., 1992; NAKAO et al., 1994).

A borreliose acomete cervídeos, os quais desenvolvem sinais clínicos da doença, mas atuam como reservatórios de *Borrelia* spp. no ambiente silvestre (STEERE et al., 1983; MAGNARELLI et al., 1995a).

Na América do Norte, o veado da cauda branca (*Odocoileus virginianus*) é o principal reservatório (MAGNARELLI et al., 1995a,b), embora outras espécies como o *Cervus nippon yesoensis* (KIMURA et al., 1995) também podem atuar como reservatório. Portanto, os cervídeos são considerados animais sentinelas para esta enfermidade (GILL et al., 1994).

Os roedores possuem uma estreita ligação com os micro-organismos do gênero *Borrelia*, atuando como principais reservatórios e carreadores de *B. recurrentis*, transportando-a do ambiente silvestre ao peri - domiciliário (BRUMPT, 1927; BARBOUR; HAYES, 1986). Da mesma forma, a *B. burgdorferi* também é mantida na natureza pelos roedores silvestres (MASUZAWA et al., 1995; JAENSON; TALLEKLINT, 1996). O roedor da pata branca (*Peromyscus leucopus*) e outros membros do gênero são os reservatórios naturais de *B. burgdorferi* na América do Norte (LANE et al., 1994; MAUPIN et al., 1994; WALKER et al., 1996).

Na Europa, os roedores envolvidos pertencem, principalmente, ao gênero *Apodemus* (KURTENBACH et al., 1995). Na Ásia, tanto o gênero *Apodemus*, quanto o gênero *Eothenomys* têm participação no ciclo da borreliose na espécie da *Borrelia japonica* (MASUZAWA et al. 1995).

Os roedores têm sido utilizados como modelos para bioensaios com *Borrelia* em laboratórios de pesquisas (MASUZAWA et al., 1992; PACHNER et al., 1995). Foram

realizados estudos experimentais com carrapatos avaliando-se o potencial de transmissão, patogenicidade de cepas, ultramicrscopia de tecido infectado, desenvolvimento de vacinas, ensaios com drogas e expressão genética de *Borrelia* spp. (JOBE et al., 1993; PACHNER et al., 1995).

Outros animais silvestres como carnívoros (*carnivora*), marsupiais (*marsupialia*) e lagomorfos (*lagomorpha*) podem albergar *Borrelia* spp. no sangue e/ou nos tecidos, entretanto, a sua participação no ciclo epidemiológico da borreliose é ainda discutível (MCLEAN et al., 1993a; MAGNARELLI et al., 1995c).

No Brasil, estudos demonstram que os marsupiais podem participar na epidemiologia da doença de Lyme (YOSHINARI et al., 1995; 1997), uma vez que foram observadas espiroquetas com características morfológicas de *Borrelia* spp. em sangue periférico de *Didelphis (marsupialis)* (YOSHINARI et al., 1995; 1997), sendo estas espiroquetas infectantes para camundongos albinos (Swiss) (BARBOZA et al., 1998).

As relações entre os marsupiais e esta espiroqueta estão em discussão, embora ela tenha homologia antigênica, frente aos ensaios imunológicos (ELISA e western-blotting), com *B. burgdorferi* (YOSHINARI et al., 1995, BONOLDI et al., 1996).

A borreliose também vem sendo pesquisada, em relação a casos concomitantes com ehrlichiose humana (MAGNARELLI et al., 1995b). Existem atualmente duas espécies descritas no homem, *Ehrlichia chaffeensis* que tem como principal vetor o *Amblyomma americanum*, que também transmite *Borrelia* e a Ehrlichia granulocítica humana, cujo principal vetor é o *I. dammini*, podendo também ser transmitida por outros carrapatos (CHEN et al., 1994; RIKIHISA et al., 1994).

A coexistência de anticorpos para babesiose humana, ehrlichiose e borreliose tem sido observada em soros de pacientes de áreas de risco para estas enfermidades (MAGNARELLI et al., 1995a, 1995b). Este fenômeno é pertinente, pois o roedor de pata branca *Peromyscus leucopus* (white-footed mouse), é o reservatório da *B. burgdorferi* e *B. microti* e, da mesma forma o cervídeo *Odocoileus virginianus*, chamado “white-tailed deer” é o reservatório de *Ehrlichia chaffeensis* e de *B. burgdorferi* (DUMLER et al., 1995).

A epidemiologia da borreliose em animais e em seres humanos apresenta características variadas de acordo com a região geográfica, dada a existência de genoespécies e cepas de *Borrelia* diferentes, distintos carrapatos vetores, interações vetor patógeno e de ecossistemas diversificados (BARANTON et al., 1992; BENNETT, 1995). Os animais domésticos são competentes reservatórios de *Borrelia* spp. no ambiente domiciliar (MATHER et al., 1994).

Na literatura científica disponível sobre infecções por parasitas do gênero *Borrelia* em animais de produção não existe relatos de ocorrência desta enfermidade em Moçambique, embora haja relatos de ocorrência dos carrapatos considerados vetores do patógeno causador de borreliose.

2.5 Técnicas de diagnóstico de hemoparasitos transmitidos por carrapatos

O diagnóstico das doenças transmitidas por carrapatos em nível de campo é realizado com base na sintomatologia clínica, mas este método é complexo e de baixa sensibilidade, além da similaridade dos sinais clínicos com outras enfermidades de origem infecciosa e parasitária, muitas vezes co-associadas. Sendo assim é mais sensato recorrer aos exames hematológicos, através da observação direta dos parasitos em esfregaços sanguíneos corados com substâncias específicas e examinados ao microscópico óptico ou a métodos indiretos através da detecção de anticorpos por meio de testes sorológicos ou detecção do ácido desoxirribonucléico (DNA) do parasito através de técnicas de diagnóstico moleculares.

O diagnóstico clínico é feito com base nos sintomas e histórico de infestação de carrapatos. Entretanto, como estes sintomas não são específicos, deve-se realizar os exames laboratoriais para a confirmação da suspeita clínica. Os agentes etiológicos da doença podem ser visualizados diretamente por meio do exame parasitológico de esfregaço de sangue corados com *Giemsa* ou derivados de Romanowsky (HARVEY et al., 1978). A confecção dos esfregaços deve ser efetuada através de uma gota de sangue da ponta da orelha ou cauda do animal (NEITZ; THOMAS, 1938).

Devido às dificuldades que os clínicos enfrentam no diagnóstico das hemoparasitoses em nível de campo, em animais com ou sem sintomas clínicos, torna-se importante direcionar o diagnóstico através da utilização de técnicas laboratoriais a partir de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (WALTISBUHL et al., 1987; DE ECHAIDE et al., 2005; CONRATHS; SCHARES, 2006; GASSER, 2006).

O método parasitológico continua sendo válido e consiste na demonstração do parasito a partir do material encaminhado ao laboratório que pode ser sangue ou fragmentos de tecidos de diferentes órgãos do animal em exame *pos mortem* (SINGH, 1997).

Nas últimas décadas, diversas provas sorológicas foram desenvolvidas como o Dot-ELISA (MONTENEGRO-JAMES et al., 1990), os testes de aglutinação e suas variações, o “teste do cartão” (TC) (TODOROVIC et al., 1977) e o teste de congutinação rápida (TCR) (ARAÚJO et al., 1997). Apesar de apresentarem em geral sensibilidade baixa, estes testes apresentam menor custo, economia de tempo e praticidade na execução e podem ser utilizados em estudos epidemiológicos e na avaliação das medidas preventivas de doenças transmitidas por carrapatos (ROSS; LOHR, 1968). O teste de fixação de complemento é primariamente utilizado para detecção de anticorpos da classe IgM, ou seja, para detecção de animais recentemente infectados (BÖSE et al., 1995)

No intuito de aumentar a confiabilidade dos resultados, outras técnicas de diagnóstico têm sido utilizadas, destacando-se a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Aglutinação em Látex e o ensaio de imunoabsorção enzimática indireto (ELISA-i) (CALLOW et al., 1981).

A RIFI tem sido considerada teste padrão e é comumente utilizado em vários países para o diagnóstico em situações em que se pretende saber se o agente etiológico suspeito entrou ou não em contato com o rebanho (CALLOW et al., 1981).

O teste de ensaio de imunoabsorção enzimática indireto (ELISA-i) mostra-se ser o mais prático na sua utilização, devido a sua facilidade de execução, leitura mecânica e fornecimento rápido dos resultados, sendo desta forma, o método de eleição para muitos estudos epidemiológicos que envolvem maior número de amostras (MOLAD et al., 2006; FOSGATE et al., 2010; NDOU et al., 2010).

Vale ressaltar que nos testes sorológicos não existe um do ponto de corte standard devendo este ser calculado segundo formulas matemáticas definidas mediante a metodologia utilizada por cada pesquisador na execução do teste, número controles negativos e positivos utilizados no teste para a detecção de anticorpos contra o parasito que está sendo pesquisado.

Atualmente, com o advento das técnicas de diagnóstico a partir da biologia molecular vem revolucionando o diagnóstico de várias enfermidades, incluindo as hemoparasitoses, transmitidos por carrapatos, pois estas técnicas caracterizam-se por possuírem alta sensibilidade e especificidade (GASSER, 2006). As técnicas moleculares se baseiam na detecção do DNA genômico do parasito no material amostral, através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) (LEW; JORGENSEN, 2005).

A PCR é hoje considerada um dos métodos de diagnóstico direto mais sensível, rápido e específico. Tem sido utilizada como técnica de detecção de parasitas em animais clinicamente saudáveis, além de caracterizar as diferentes espécies presentes nos animais e

também é empregada em alguns estudos epidemiológicos de diferentes patógenos (PERSING et al., 1992; DUMLER et al., 2001; GASSER, 2006).

Outras técnicas resultantes de modificações da PCR também têm sido desenvolvidas com o intuito de aumentar a sensibilidade e a especificidade desta metodologia de diagnóstico e pesquisa científica, como por exemplo, a “nested PCR” (nPCR) (TORIONI et al., 1998).

A nPCR é capaz de detectar pequenas quantidades de DNA (BÖSE et al., 1995) e consiste na utilização de sequências de “primers” ou iniciadores internos utilizados na primeira reação da PCR, que anelam ao fragmento amplificado pela primeira PCR em uma segunda amplificação, com o objetivo de aumentar o número de cópias da sequência alvo e consequentemente a sensibilidade do teste (FIGUEROA et al. 1996).

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

Existem também a PCR combinada com análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) (CARRET et al., 1999) e a PCR em tempo real (PETERS et al., 2004).

A sensibilidade da PCR para a detecção de patógenos tem se mostrado melhor que os métodos de diagnóstico microscópico e sorológico, embora as técnicas de PCR ainda demandem um relativo consumo de tempo, custo e requerem procedimentos mais complexos.

O desenvolvimento de várias metodologias desta técnica resultou numa inovação tecnológica, a PCR em tempo real, que vem ganhando espaço e aceitação nos laboratórios especializados em diagnóstico clínico e pesquisa científica por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos (KIM et al., 2007). A técnica permite o acompanhamento de todas as etapas da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, quando comparado com a PCR convencional que apresenta apenas os resultados qualitativos. Também requer o processamento pós-PCR, como a eletroforese em gel de agarose.

2.5.1 Diagnóstico de *Babesia bigemina* e *B. bovis*

Na babesiose aguda a doença é caracterizada não só pelos sinais de hemólise, mas também por alta parasitemia (BÖSE et al., 1995). Nessa situação o exame direto de esfregaços sanguíneos colhidos de ponta da cauda ou da orelha é o método de diagnóstico mais empregado, devido a sua facilidade na execução e baixo custo, embora requer certa habilidade no exame microscópico das lâminas. Porém, a baixa sensibilidade desta técnica é um fator limitante para a sua aplicação em estudos epidemiológicos em decorrência da incapacidade de não poder detectar animais cronicamente infectados (BÖSE et al., 1995; COSTA-JUNIOR et al., 2006).

Nestas circunstâncias, as técnicas sorológicas para pesquisa de anticorpos específicos têm sido frequentemente empregadas em estudos epidemiológicos da babesiose e com base no *status* imunológico dos animais é possível definir a situação epidemiológica de uma determinada região quanto a ocorrência desses hemoparasitos (MAHONEY et al., 1973).

A sensibilidade e a especificidade do teste de ELISA-i são influenciadas pela qualidade do antígeno que está sendo utilizado, a técnica tem a vantagem de ser muito objetiva, além de possibilitar o exame de um número considerável de amostras em curto espaço de tempo, a sua leitura é automatizada, muito rápida na execução, sendo por isso indicada para a realização de inquéritos soropidemiológicos envolvendo maior número de amostras em áreas endêmicas (TEMBUE et al., 2011a).

As técnicas sorológicas embora apresentem elevada sensibilidade e especificidade, possuem suas limitações uma vez que apenas indicam a exposição dos animais ao agente etiológico e não informam sobre o curso da infecção (WAGNER et al., 1992).

Com o desenvolvimento das técnicas moleculares de diagnóstico houve um salto qualitativo na elevação da sensibilidade e especificidade na detecção e diagnóstico dos agentes etiológicos pois, permite discriminar os animais infectados que apresentam baixa parasitemia daqueles que por terem conseguido eliminar as infecções no organismo não são fonte de infecção para os carrapatos, além de diferenciar entre os animais vacinados dos não vacinados (DE LA FUENTE et al., 2010).

A utilização das técnicas de PCR na investigação epidemiológica das infecções do gênero *Babesia* tem produzido informações bastante relevantes, uma vez que permite a detecção dos agentes etiológicos tanto nos hospedeiros vertebrados, quanto nos hospedeiros invertebrados (OLIVEIRA et al., 2005, TEGLAS et al., 2005; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005).

2.5.2 Diagnóstico de *Anaplasma marginale*

Com relação a anaplasmosse bovina a infecção aguda é diagnosticada com base na anamnese, sinais clínicos, determinação do volume globular e demonstração da rickettsia intra-eritrocítica em esfregaços de sangue corados com *Giemsa* (WANDURAGALA; RISTIC, 1993). A técnica de esfregaço sanguíneo continua sendo válida e de maior praticidade para diagnóstico das infecções por *A. marginale*, especialmente, durante a fase aguda, quando a maior parte dos eritrócitos está parasitada (HART et al., 1992). Contudo, trata-se de um método pouco sensível e incapaz de detectar o parasita nos casos de baixos níveis de rickettsemia que ocorrem predominantemente durante a fase crônica (KIESER et al., 1990).

De acordo com Trueblood et al. (1991), o fato dos animais persistirem infectados após se recuperarem de uma primo-infecção por *A. marginale* faz com que os níveis de anticorpos se mantenham elevados, favorecendo com isso a possibilidade da realização de diagnóstico indireto, por diferentes métodos imunoenzimáticos.

No entanto, McGuire et al. (1991) consideraram que as técnicas imunológicas apresentam um elevado índice de erros em função, principalmente, de resultados falsos positivos cuja principal causa seria a contaminação dos antígenos utilizados por proteínas de eritrócitos.

Várias técnicas imunológicas têm sido descritas para o diagnóstico da anaplasmosse bovina e dentre elas, destacam-se, o teste de aglutinação rápida em cartão (TC) (TODOROVIC et al., 1977), aglutinação em tubo capilar (AC) (RISTIC, 1962), aglutinação em microesferas de látex (AL) (RODGERS et al., 1998), (FC) (TODOROVIC et al., 1977, GOFF et al., 1990), (RIFI) (GONZALEZ et al., 1978; MONTENEGRO-JAMES et al., 1985), radioimunoensaio (RIA) (SCHUNTNER; LEATCH, 1988) e o (ELISA-i) (THOEN et al., 1980; KNOWLES et al., 1982; BARRY et al., 1986).

Hungerford e Smith. (1997) desenvolveram um teste de aglutinação em cartão modificado mais sensível, utilizado para estimar a prevalência da anaplasmosse bovina.

Wright (1990) demonstrou que o teste de aglutinação em tubo capilar (CTA) apresenta como principais vantagens a rapidez na execução e a possibilidade de realização em campo, enquanto que na fixação do complemento (FC), há necessidade da padronização correta de todos os reagentes, requerendo mais tempo para execução e para a obtenção dos resultados. Além disso, reações falsas negativas ocorrem em testes de fixação de complemento devido à falha na detecção de todos os tipos de imunoglobulinas de bovinos (McGUIRE et al., 1991).

A aglutinação em látex, que utiliza microesferas sensibilizadas com o antígeno cultivado *in vitro*, apresenta maior sensibilidade e especificidade que o teste do cartão (TC), aglutinação em tubo capilar e fixação de complemento (RODGERS et al., 1998). Por outro lado, a radio imunoenensaio apresenta sensibilidade e especificidade semelhantes ao ensaio de imunoadsorção enzimático indireto, contudo requer a utilização de substâncias radioativas e equipamentos laboratoriais mais sofisticados (WRIGHT, 1990).

A maioria destes testes imunoenzimáticos apresenta um certo grau de erros refletidos na baixa sensibilidade e especificidade dos antígenos utilizados, que correspondem a preparações obtidas a partir do sangue de bezerros recém-nascidos ou esplenectomizados e infectados experimentalmente, com um agente etiológico isolado e por esse motivo, apresentam-se contaminadas por componentes celulares do hospedeiro vertebrado, o que determina a inespecificidade às reações sorológicas (WRIGHT, 1990; RODGERS et al., 1998). Resultados falsos positivos ocorrem quando antígenos são detectados por anticorpos contra eritrócitos presentes no soro de bovinos (WRIGHT, 1990; RODGERS et al., 1998).

Entre os testes sorológicos mais utilizados para imunodiagnóstico da anaplasmoze bovina, destacam-se a RIFI e o ELISA-i (THOEN et al., 1980; NIELSEN et al., 1996).

A RIFI é um teste sorológico simples e sensível para detecção de animais infectados com *A. marginale*, quando comparada com Teste de Cartão (TODOROVIC et al., 1977). Vários destes testes foram utilizados em estudos de soroprevalência da anaplasmoze bovina em diferentes regiões geográficas do mundo (JORGENSEN et al., 1992) e tem sido recomendado para pesquisas que requerem titulações seriadas (WILSON et al., 1978),

Goff et al. (1982) desenvolveram um teste de imunofluorescência indireta modificado utilizando microfluorometria, o que proporcionou uma maior sensibilidade ao teste para identificação de bovinos infectados por *A. marginale*.

Embora o teste de RIFI seja uma das técnicas mais utilizadas, na última década o teste de ELISA-i tem apresentado maior sensibilidade e especificidade, com a vantagem de seus resultados poderem ser obtidos diretamente através de um leitor automático, evitando problemas com interpretações dúbidas de origem humana nas reações fraco-positivas observadas com maior frequência no teste de RIFI (NAKAMURA et al., 1988, NIELSEN et al., 1996).

Vários testes de ELISAs foram desenvolvidos para a detecção da infecção por *A. marginale*, utilizando anticorpos monoclonais (TRUEBLOOD et al., 1991), ou pela detecção de anticorpos circulantes (MOLLOY et al., 1999).

Os avanços observados só foram possível graças ao desenvolvimento do diagnóstico sorológico da anaplasmoze bovina, caracterizando antígenos de *A. marginale* através da clonagem de genes e da produção de proteínas recombinantes (REYNA-BELLO et al., 1998).

As análises antigênicas das proteínas de membrana de superfície de *A. marginale* revelaram que seis proteínas principais de superfície ou “major surface proteins” (MSP) são reconhecidas por anticorpos produzidos por bovinos infectados com diferentes isolados de *A. marginale* (KOCAN et al., 2003). As investigações realizadas com essas seis proteínas principais têm revelado que elas estão envolvidas em distintas atividades biológicas do parasita (KOCAN et al., 2003).

As MSPs são altamente antigênicas em todos os estágios da infecção, inclusive em bovinos persistentemente infectados (PALMER et al., 1986; KOCAN et al., 2002).

Estas proteínas são conservadas durante o período de crescimento de *A. marginale* nos eritrócitos e glândulas salivares de carrapatos vetores, sendo envolvidas principalmente na infecção da célula do hospedeiro vertebrado (OBERLE et al., 1988; KOCAN et al., 2002).

Anticorpos contra as MSPs estão envolvidos com três mecanismos de proteção contra infecção, incluindo a neutralização devido à ação direta dos anticorpos, citotoxicidade celular dependente de anticorpos por linfócitos não restritos ao complexo principal de

histocompatibilidade (MHC), fagocitose pelos macrófagos mediada por anticorpos opsonizantes (PALMER et al., 1999).

Trueblood et al. (1991) desenvolveram um ensaio de imunoadsorção enzimático competitivo (ELISA-c) com MSP1a purificada, utilizando anticorpo monoclonal ANA22B1 para epítipo de linfócitos B, que apresentou ótimo desempenho na detecção de bovinos infectados na fase aguda.

Porém, a avaliação de diferentes sistemas de ELISAs com MSP3, demonstrou que esta proteína não é um bom antígeno para ser utilizado em testes imunodiagnósticos, uma vez que foi observada a conservação de epítopos de reatividade cruzada com *Anaplasma ovis* e *Ehrlichia* spp., além da ausência desta proteína entre alguns isolados de *A. marginale* (McGUIRE et al., 1991, ALLEMAN; BARBET, 1996).

Apesar dos avanços realizados na maioria dessas técnicas, estas continuam a apresentarem limitações ligadas a reatividade inespecífica, que interfere nas interpretações dos resultados (WRIGHT, 1990).

Com os avanços obtidos no campo da biologia molecular, tornou-se possível o desenvolvimento de novas metodologias para diagnóstico de parasitas baseadas na detecção de fragmentos de DNA genômico (BARKER, 1990). Os primeiros avanços científicos obtidos com a aplicação dos testes baseados na detecção de fragmentos de DNA de *A. marginale* foram revisados por diversos autores (BARBET, 1995; FIGUEROA; BUENING, 1995). Nestas publicações os autores descrevem o progresso das técnicas de biologia molecular e as consequentes descobertas que foram sendo feitas com relação a essa rickettsia.

No que se refere aos hospedeiros vertebrados, a aplicação das ferramentas moleculares no diagnóstico das infecções por *A. marginale* tem como principal vantagem a possibilidade de discriminar animais soronegativos infectados, animais em fases iniciais da infecção ou que foram infectados congenitamente (COSSÍO-BAYÚGAR et al., 1997) e distinguir animais soropositivos infectados de animais vacinados (GALE et al., 1996).

Quanto à infecção dos carrapatos, as investigações epidemiológicas foram, até recentemente, bastante limitadas pela escassez do conhecimento das interações entre os carrapatos, ambiente e a rickettsia, assim como, pela inexistência de métodos de diagnósticos adequados nessa área (OLIVEIRA-SEQUEIRA, et al., 2005). Essa limitação foi minimizada pela utilização de técnicas baseadas na PCR, pois permitem o diagnóstico direto pela detecção da rickettsia nos vários estágios de desenvolvimento dos artrópodes (OLIVEIRA et al., 2005).

Com a utilização da biologia molecular foi possível caracterizar cinco proteínas de superfície de membrana “major surface proteins” - MSPs, de *Anaplasma marginale*, nos estágios eritrocíticos e em carrapatos transmissores (PALMER et al., 1986; VISSER et al., 1992). Estas proteínas funcionam como transportadores de nutrientes e estão envolvidas nos processos de aderência e na invasão das células do hospedeiro, bem como na geração de novos antígenos, que vão manter uma infecção persistente (DE LA FUENTE et al. 2001a).

2.5.3 Diagnóstico das espécies do gênero *Borrelia*

Com relação à borreliose o diagnóstico pode ser realizado em animais e seres humanos, através de esfregaços sanguíneos corados pelo *Giemsa*, entretanto, os agentes etiológicos só são detectáveis em casos de alta espiroquetemia (BRUMPT, 1927; MATTON; MELCKEBEKE, 1990).

Os esfregaços também podem ser feitos a partir de fragmentos de tecidos do carrapato como intestino, glândula salivar e ainda hemolinfa, corados também pelo *Giemsa*, método muito utilizado no estudo de *Borrelia anserina* e *B. theileri* no carrapato vetor (SMITH et al. 1978; VIVAS et al., 1996). Nos tecidos de animais, as colorações oferecem boas

visualizações. A habilidade na observação microscópica é importante dado o grande pleomorfismo das borrelias (ABERER; DURAY, 1991).

Em bovinos com claudicação e edema articular, outras causas devem ser consideradas além da borreliose (BUSHMICH, 1994). Por isso, é complexo estabelecer uma definição clara do caso e o diagnóstico presuntivo da enfermidade tem sido baseado em um conjunto de informações desde o histórico, vetores envolvidos, sinais clínicos, testes sorológicos e resposta dos animais acometidos a terapia (POST et al., 1986; POST, 1990).

A recuperação e o isolamento da bactéria podem ser feitos através de filtração em aparelhos próprios de 0,20 a 0,45µm (JOBE et al., 1993).

No isolamento utiliza-se o meio de Barbour Stoenner e Kelly (BSK), o meio de Kelly, o meio de Stoenner, ou similares, nos quais se faz a sementeira de sangue, fragmentos de tecidos ou de carrapatos, obtendo-se o crescimento da espiroqueta a 33°C em aproximadamente uma semana (KUIPER et al., 1994; LEBECH et al., 1995).

O isolamento de algumas espécies de *Borrelia* também tem sido realizado a partir de saliva, fragmentos de glândula salivar e intestino dos carrapatos *Ixodes scapularis*, *I. dammini*, *I. pacificus*, *I. persulcatus*, *I. ricinus*, *I. ovatus*, *Amblyomma. americanum*, *Dermacentor variabilis* (NAKAO et al., 1992; TAKADA et al., 1994; TALLEKLINT; JAENSON, 1996).

No entanto, existem limitações, pois nem todas as espécies de *Borrelia* são de fácil cultivo ou ainda não são cultiváveis (SMITH; ROGERS, 1998; OLIVEIRA et al., 2004). A visualização destas espiroquetas pode ser realizada em microscopia de campo escuro, de contraste de fase e em tecidos corados pela prata (BARBOUR; HAYES, 1986).

Segundo Hadani et al. (1985) a identificação de espécies de *Borrelia* baseada em características bioquímicas não é possível, pois, não tem como fazer a diferenciação entre as espécies.

A imunohistoquímica é o método que apresenta excelentes resultados já que permite a observação de *Borrelia* e a caracterização microscópica da lesão e ainda revela marcações antigênicas do patógeno no tecido em humanos, tem-se encontrado dificuldades na obtenção de fragmentos de tecidos, sendo esta técnica pouco utilizada (LEBECH et al., 1995).

O ensaio de imunoabsorção enzimático indireto (ELISA-i) tem sido utilizado em amostras de tecidos do carrapato *I. dammini* para a detecção de antígenos de *Borrelia burgdorferi* com bons resultados, mesmo utilizando anticorpos policlonais (DORWARD et al., 1991).

A RIFI é outro teste que tem sido utilizado no diagnóstico de borreliose, podendo ser empregado para triagem em estudos epidemiológicos envolvendo maior número de amostras (BURGDORFER, 1993; BENNETT, 1995).

Russell et al. (1984) demonstraram uma sensibilidade e especificidade semelhante entre RIFI e ELISA-i, embora a maioria dos estudos revela certa superioridade do ELISA-i, em termos de sensibilidade, especificidade e operacionalidade (STIERNSTEDT et al., 1985; GOLIGHTLY, 1993).

Magnarelli e Anderson (1998) desenvolveram ELISA-i para detecção de anticorpos das classes IgM e IgG em seres humanos, tendo observado a ausência de reações cruzadas entre *B. burgdorferi*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* e *L. grippityphosa*, sugerindo que o teste de ELISA-i padronizado poderia ser utilizado para o diagnóstico da borreliose e no diagnóstico diferencial com outras espiroquetoses.

No teste de ELISA-i, antígeno sonicado ou frações protéicas podem ser usados como antígeno (BENNETT, 1995; OKSI et al., 1995), sendo o antígeno sonicado o mais empregado (CRAFT et al., 1984; MAGNARELLI et al., 1994a).

O teste de ELISA-i para detecção de antígenos de *Borrelia* ainda tem sido utilizado, em amostras de urina e sangue de mamíferos (HYDE et al., 1989; DOWARD et al., 1991;

MAGNARELLI et al., 1994b). Cada método de detecção de anticorpos tem vantagens e desvantagens quanto à sensibilidade, especificidade, facilidade de padronização e custo (MAGNARELLI et al., 2004).

Em todas as regiões onde se tem relato de borreliose, o teste de ELISA-i tem sido utilizado para diagnóstico e levantamentos epidemiológicos, representando a principal ferramenta imunológica, devido a sua sensibilidade e especificidade alta (MAGNARELLI et al., 1987).

O western blotting é outro teste que tem sido empregado em casos de dúvida no método de ELISA-i. O inconveniente do imunoblotting é a obtenção do padrão positivo ideal (gold standard) pelos laboratórios, o que se torna difícil, exceto em caso de imunizações experimentais (ENGSTROM et al., 1995).

Grodzicki e Steere (1988) demonstraram eficiência superior do western blotting em relação ao ELISA-i para a doença de Lyme, pois esta técnica é mais sensível e específica, podendo ser usada como confirmatório do teste de ELISA-i (DRESSLER et al. 1993).

Fonseca et al. (1996) avaliando soros de bovinos também comprovou a superioridade do Western blotting como teste de diagnóstico. Contudo, este ensaio deve seguir critérios de interpretação, pois existem variações antigênicas regionais para a *Borrelia*, além de espécies distintas e homólogas (CRAFT et al., 1986; RAHN; MALAWISTA, 1991). Portanto, deve-se, estabelecer qualidade de bandas reativas de acordo ao antígeno utilizado para cada região estudada, e também quantidades de bandas, sendo de no mínimo cinco (GOLIGHTLY, 1993; ENGSTROM et al., 1995).

As reações cruzadas têm sido descritas entre *B. burgdorferi* e *L. interrogans*, com algumas variantes sorológicas, entretanto, estas reações ocorrem em alguns laboratórios dependendo do preparo do antígeno e do ensaio empregado (MITCHELL et al., 1994). São frequentes as reações cruzadas entre os membros do gênero *Borrelia*, em bovinos (DONOGHUE; VAN VEEN, 1989). Muitas reações cruzadas são descritas no emprego de técnicas de aglutinação, entre *Borrelia* spp., *Treponema* spp., e *Leptospira* spp. (BAKER-ZANDER; LUKERHART, 1984). Para se contornar estas reações entre antígenos heterólogos devem ser realizadas diluições seriadas (MEREDITH et al., 1995). Mesmo que haja o parasitismo mútuo por *Borrelia* spp. e outros hematozoários, como protozoários e rickettsias, não ocorrem reações cruzadas, havendo sim a coexistência de anticorpos distintos, como foi comprovado em seres humanos (MAGNARELLI et al., 1995a).

O teste de ELISA-i é amplamente empregado para pesquisa de anticorpos em amostras de soros de animais silvestres como roedores, cervídeos, marsupiais, carnívoros e aves, de modo que o teste tem auxiliado muito no conhecimento epidemiológico da borreliose em diferentes espécies animais, além de certificar animais sentinelas (MAGNARELLI et al., 1995a, b).

O diagnóstico correto da borreliose implica necessariamente, na qualidade do teste empregado. O teste de ELISA-i tem sido testado e reconhecido como sendo o melhor para estudos epidemiológicos, no entanto, requer o estabelecimento de padrões de controles de qualidade adequados para cada laboratório, com o título mínimo e linha de corte seguro e confiável.

A biologia molecular é uma ferramenta de diagnóstico que vem crescendo no estudo de diversas enfermidades, incluindo a borreliose. A PCR garante resultado bastante seguro e específico, pois se baseia na amplificação do fragmento de DNA genômico do agente pesquisado, se apresentando como o mais preciso dos ensaios utilizados no momento. Essa técnica tem sido empregada em fluidos e tecidos de humanos e animais e fragmentos de carrapatos (LIENBLING et al., 1993; MOTER et al., 1994; ZBINDEN et al., 1994), estando ainda relacionada às manifestações clínicas e respostas sorológicas (LEBECH; HANSEN, 1992; KARCH et al., 1994; MOURITSEN et al., 1996).

2.5.4 Inquérito de opinião

Um questionário semi-estruturado foi elaborado segundo a metodologia por (THRUSFILED, 2004) com modificações e pré-testado com objetivo de aperfeiçoá-lo quanto à complexidade das perguntas e sequência lógica das perguntas de acordo com os objetivos, maximização da clareza, foram adicionados várias perguntas ou itens que pudessem servir como auxílio na obtenção de informações. Foram determinadas as áreas temáticas da abordagem e avaliadas a coesão das mesmas. Foram abordadas questões com objetivo de colher informações sobre as características das criações de bovinos visitadas, o perfil e a percepção dos criadores de bovinos das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique sobre a importância dos carrapatos mais importantes em Moçambique na sanidade dos rebanhos e também sobre como os criadores de bovinos tem atuado no controle dos carrapatos dos bovinos. Este método de estudo tem sido utilizado para detectar problemas relacionados com gestão. Manejo e propor soluções junto aos criadores e gestores da pecuária nacional no novo contexto de produção pecuária.

Diante dos criadores os responsáveis da gestão pecuária a nível local, realizam as apresentações das pessoas da equipe de trabalho segundo os usos e costumes de cada região em seguida eram feito o devido esclarecimento dos objetivos da pesquisa, o vínculo institucional dos componentes da equipe visitante e sobre a confidencialidade dos dados fornecidos, bem como a obtenção do termo de consentimento livre esclarecido junto ao proprietário. Assim realizado, os proprietários ou administradores de cada criação visitada foram entrevistados por um único entrevistador, sem interferência no preenchimento dos questionários, o que permitiu uma padronização da abordagem e máximo de imparcialidade. As perguntas foram redigidas em linguagem acessível ao criador independente do seu nível acadêmico e as perguntas organizadas de modo a permitir que a entrevista fosse realizada com rapidez e eficácia e as respostas compiladas simultaneamente com as respectivas respostas. Mesmo assim as perguntas eram traduzidas na hora na língua local do domínio do entrevistado o que permitiu uma boa interação e fornecimento das respostas de forma rápida e espontânea.

2.6 MATERIAL E MÉTODOS

2.7 Descrição do local de estudo

A Região Sul de Moçambique é formada por províncias de Maputo, Gaza e Inhambane (Figura 5) e ocupam uma área territorial de 170.558 km², com uma população humana estimada em cerca de 4.785.916 habitantes e uma densidade populacional de 28,1 hab/km² (INE, 2007). A região é composta por 30 Distritos e concentra mais de 902.579 bovinos, o equivalente a 53,6% do efetivo nacional. Destes 844.913 bovinos são pertencentes ao setor familiar e 57.666 a privados, com relação a cada província tem-se 154.147 em Maputo com 7 Distritos, 569.404 em Gaza com 11 Distritos e 179.028 em Inhambane com 12 Distritos (TIA, 2008).

O sistema de produção pecuária na região é predominantemente tradicional, onde os animais são criados em sistema extensivo, os pequenos ruminantes e suínos são soltos e perambulam livremente nos arredores das aldeias nas comunidades. Os bovinos de pequenos criadores são geralmente conduzidos por crianças menores de idade entre 6 a 12 anos, na sua maioria não assalariados mas, em determinadas famílias é estabelecido um acordo verbal em que a família da criança trabalhadora recebe uma bezerra por ano como forma de pagamento. Os animais de diferentes criadores utilizam a mesma área de pastagem, fonte de bebedouros, tanque (sistêmico) ou corredor (pulverização) de tratamento comunitário, enquanto os bovinos

dos médios criadores são conduzidos por pessoal adulto e assalariado, estes criadores na sua maioria possuem áreas de pastagens e infraestruturas pecuárias próprias.

2.8 Tamanho da amostra

O tamanho da amostragem foi calculado de forma estratificada e proporcional a população bovina das províncias estudadas. Foi estabelecido o grau de confiança de 95%, prevalência esperada de 50% e margem de erro de 4%, e aplicada uma equação matemática descrita por Sampaio (2002). Onde, $n = z^2 \cdot p(1-p) / d^2$, sendo n o tamanho da amostra, z uma constante igual 1.96, p a prevalência esperada e d^2 , a precisão absoluta desejada.

Assim, determinou-se o número mínimo de 600 amostras de sangue a serem colhidas em bovinos de diferentes faixas etárias e de ambos os sexos, nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique. A mesma metodologia foi utilizada para o cálculo das 240 amostras de DNA para *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* uma vez que não foram usadas todas as amostras coletas por conveniência econômica.

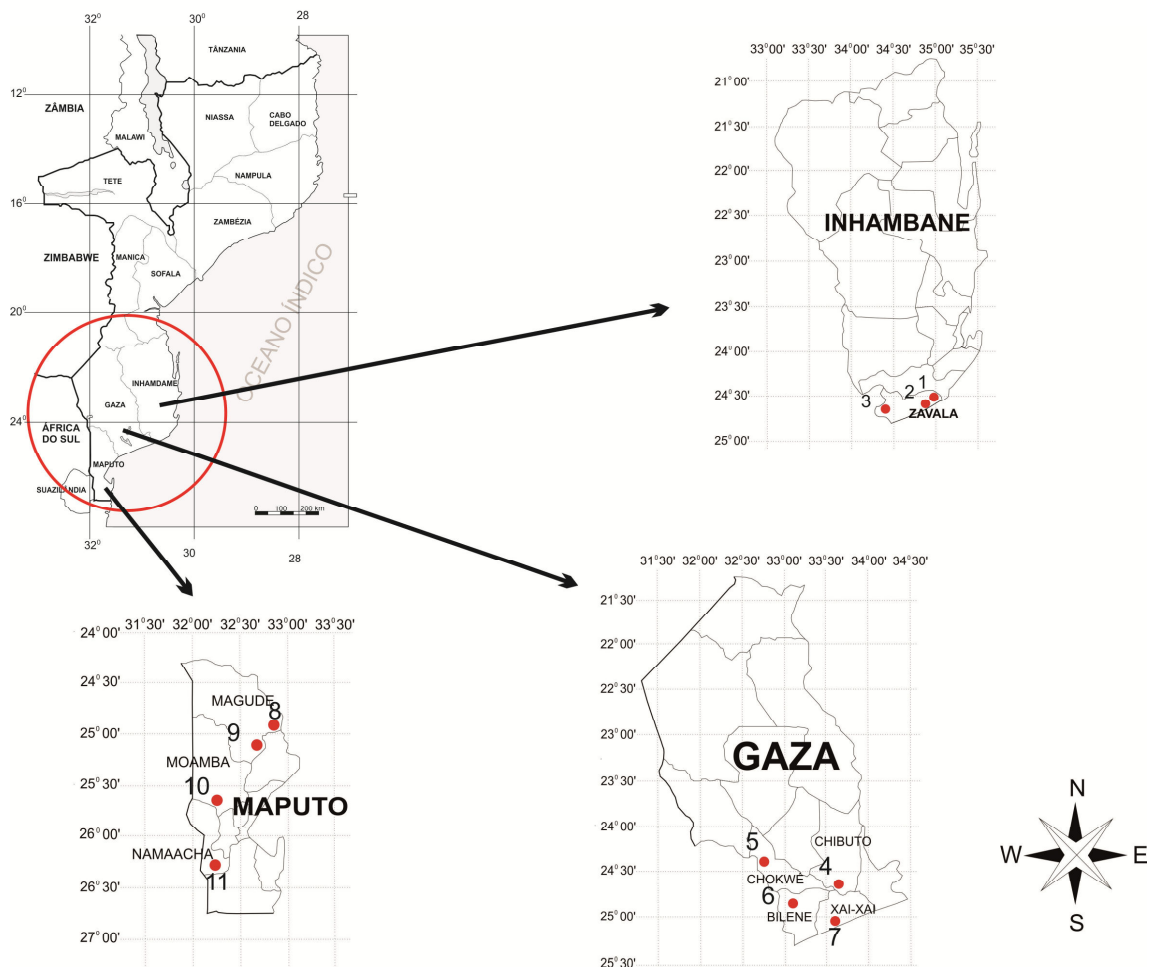


Figura 5. Localização geográfica das localidades nos Distritos estudados, conforme a província, na Região Sul de Moçambique.

1. Chitsuleta, 2. Nhamasso-Chambule, 3. Chissibuca, 4. Chibuto, 5. Chokwé, 6. Bilene, 7. Xai-Xai, 8. Estação Zootécnica de Mazimuchopes, 9. Estação Zootécnica Zootécnica da Chobela, 10. Moamba, 11. Namaacha.

Os dados oficiais dos efetivos de bovinos foram fornecidos pela Direcção Nacional de Serviços de Veterinária, do Ministério da Agricultura (TIA, 2008) e a partir do efetivo total da região estudada foi calculado o percentual da contribuição de cada província e depois com base no tamanho da amostra foi aplicada a regra de três simples para cálculo do número de amostras a ser coletada por província. A coleta das amostras foi distribuído da seguinte forma: 119 na província de Inhambane, 378 na província de Gaza e 103 na província de Maputo. A coleta das amostras em cada tanque ou corredor foi aleatória para garantir que as diferentes faixas etárias e ambos os sexos fossem representados. A coleta das amostras foi realizada nos meses de Janeiro, Fevereiro e Março de 2010.

Os animais objeto do presente estudo foram provenientes de diversas criações de pequenos e médios criadores de bovinos localizados em 11 diferentes comunidades rurais nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique como ilustra a Figura 5. Para garantir a representatividade e confiabilidade da amostragem foram colhidas 10% do total de rebanho de cada criatório nas criações visitadas. Houve situações em que o número de bovinos por criador era inferior a cinco e nestas circunstâncias todos eram coletados.

Em cada local de coleta foram registradas coordenadas geográficas com ajuda do sistema geo-referenciado o “Global Position System” (GPS), marca Garmin, por meio de escala cartográfica de latitude e longitude, pontos esses que permitiram gerar o mapa da localização aproximada da área de cada coleta, Figura 5.

No sentido norte/sul o presente estudo foi realizado primeiro no Distrito de Zavala, na província de Inhambane nas localidades de Chitsuleta, Chissibuca e Nhamasso-Chambule Chitsuleta: 24°32'33'' latitude Sul; 34°50'57'' longitude este; Chissibuca: 24°39'06'' latitude Sul; 34°22'73'' longitude este; Nhamasso-Chambule: 24°34'85'' latitude Sul; 35°01'19'' longitude este.

Na província de Gaza, o trabalho de campo foi realizado em quatro Distritos seguintes: Distrito de Bilene, localidade de Mazivila 24°51'72'' latitude Sul; 33°06'91'' longitude este; Distrito de Chokwé, localidade de Macarretane (24°21'75'' latitude Sul; 32°41'84'' longitude este; Distrito de Chibuto, localidade de Macalawane 24°40'57'' latitude Sul; 33°27'09'' longitude este; Distrito de Xai-Xai, localidade de Pontinha 25°02'73'' latitude Sul; 33°37'40'' longitude este.

Por ultimo na província de Maputo, o estudo foi realizado em três Distritos: Distrito de Magude, localidade de Chobela na Estação Zootécnica Central de Chobela 25°00'35'' latitude Sul; 32°43'85'' longitude Este; posto administrativo de Motaze na Estação Zootécnica de Mazimuchopes 24°47,60'' latitude Sul; 32°51'55'' longitude este; Distrito de Moamba, localidade de Chicochane 25°47'99'' latitude Sul; 32°11'98'' longitude este; Distrito de Namaacha, localidade de Changanane 26°23'02'' latitude Sul; 32°10'45'' longitude este.

Foram coletadas 809 amostras de sangue de bovinos de ambos os sexos, de idades variadas, compondo quatro faixas etárias (< 12 meses; > 12 a ≤ 24 meses; > 24 a ≤ 36 meses; e < 36 meses) respectivamente.

Antes da coleta do material biológico foi realizado um exame clínico que consistiu em anamnese para a obtenção de dados referentes ao estado geral dos animais, sexo, idade e condição corporal. Aspectos da coloração das mucosas oculares, oral, vaginal e presença de carrapatos foram anotados em fichas de questionário individual.

A idade dos animais foi informada pelos criadores, seus representantes e/ou gerentes. Nas circunstâncias em que isso não foi possível, a mesma era obtida através da verificação da data de nascimento indicado nos brincos ou através do exame da arcada dentária.

Dos 809 animais coletados, 184 foram colhidas na província de Inhambane, [Chitsuleta (n = 61); Chissibuca (n = 64) e Nhamasso-Chambule (n = 59)], 450 na Província

de Gaza [Mazivila (n = 104); Macarretane (n = 47; Macalawane (n = 163) e Pontinha (n=136)] e 175 na província de Maputo, [Estação Zootécnica Central de Chobela (n = 58 e Estação de Zootécnica Mazimuchopes (n = 21)]; [Chicochane (n = 48) e [Changalane (n = 48)].

2.9 Coleta de amostras de sangue

De cada animal foram colhidos assepticamente amostras de sangue, através da venopunção coccígea/jugular, utilizando o sistema vacutainer e tubos de 5mL e 10mL, com e sem anticoagulante. Os tubos contendo as amostras sanguíneas foram devidamente identificados e mantidos sob refrigeração em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e conduzidos ao Laboratório. As amostras provenientes da província de Inhambane foram processadas no Laboratório dos Serviços de Atividades Econômicas do Distrito de Zavala, na província de Inhambane; as da província de Gaza foram processadas no Laboratório de Veterinária Regional Sul-Gaza/ Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM) e as da província de Maputo foram conduzidas ao Laboratório Central de Veterinária, na Direção de Ciências Animais do IIAM.

Nestes Laboratórios as amostras sem anticoagulante foram submetidas à centrifugação a 2000xg por 10 minutos para separação do coágulo e obtenção do soro. Aproximadamente 1mL de soro de cada amostra foi aliqotado em microtubos de poliestireno tipo eppendorf de 1,5 mL, devidamente identificados e acondicionados em freezer à temperatura de -20°C até a realização dos testes sorológicos.

As amostras de sangue contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante também foram acondicionadas em microtubos iguais e armazenadas a -70°C para posterior extração do ácido desoxirribonucléico (DNA) genômico.

CAPÍTULO I

PERCEPÇÃO DOS CRIADORES SOBRE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS E SUA IMPORTÂNCIA EM BOVINOS NA REGIÃO SUL DE MOÇAMBIQUE

ESUMO

O presente trabalho descreve o perfil de pequenas criações e criadores de bovinos em relação a sua percepção sobre doenças transmitidas por carrapatos e sua importância em bovinos na Região Sul de Moçambique, com base em inquérito investigativo e observacional. Um total de 111 pequenos criadores, gerentes e/ou seus representantes foram entrevistados com uso de um questionário semi-estruturado com perguntas e respostas fechadas. Em 100% (n = 111) das criações visitadas, o rebanho bovino era formado por animais com aptidão para carne. Dentre os pequenos criadores, 54,1% (n = 60) se declararam como agro-pecuários, 40,5% (n = 45) além da atividade agrária trabalham como mineiros na África do sul e 5,4% (n = 6) disseram que além da pecuária também exercem a atividade comercial. O sistema de criação é extensivo e ocorre em 100% (n = 111) das criações, também foi observado que a gestão da atividade é realizada pelos proprietários, gerentes ou seus empregados. Os resultados demonstraram que as criações possuem potencial para aumentar sua produção e produtividade, mas os pequenos criadores necessitam de maiores informações sobre a profilaxia e prevenção de doenças parasitárias e infecciosas, bem como da utilização correta de fármacos tanto para o tratamento quanto para o controle de carrapatos, para se adequarem ao mercado competitivo da pecuária. Na Região Sul de Moçambique o risco de ocorrência de surtos de doenças transmitidas por carrapatos é mínimo para os animais adultos, com exceção dos animais importados de áreas de instabilidade enzoótica. Contudo, medidas preventivas devem ser adotadas para os animais em crescimento, principalmente, para aqueles com mais de seis meses de idade.

Palavras chaves: Bovinos, babesiose, anaplasmosse, produtores rurais.

ABSTRACT

This paper describes the profile of small farms and creators of cattle in southern Mozambique, for diseases transmitted by ticks, based on investigative and observational survey. A total of 111 small creators, managers and /or their representatives were interviewed using a semi-structured questionnaire with closed answers. In 100% (n = 111) of farms visited, the herd consisted of animals with an aptitude for meat and with different degrees of blood. Among small farmers, 54.1% (n = 60) declared themselves as agricultural and livestock, 40.8% (n = 45) as having agricultural activity and miners working in South Africa and 5.4% (n = 6) said that besides cattle also have commercial activity. The free range system is used in 100% (n = 111) of the creations, and daily management carried out by owners, managers or employees was also observed. The results showed that, in general, the properties have the potential to increase production and productivity, but small farmers need as well as basic education on prophylaxis and prevention of infectious and parasitic diseases, correct use of both drugs for the treatment or control of ticks, to suit the competitive system of meat in the market. In southern Mozambique, the risk of outbreaks of diseases transmitted by ticks is minimal for adult animals except for animals imported from enzootic areas of instability. However, preventive measures should be adopted for growing animals, especially for those with less than three months old.

Keywords: beef cattle, babesiosis, anaplasmosis, farmers

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura é uma atividade amplamente praticada por grande parte da população moçambicana, visando à produção sustentável de carne, leite e outros derivados de origem animal. Este tipo de atividade constitui-se numa importante fonte de fornecimento de proteína de origem animal para alimentação da população humana e uma alternativa de rendimento para a maioria das famílias rurais de baixa renda no país.

O efetivo bovino nacional tem crescido nas últimas décadas, fruto do programa de repovoamento pecuário, aprovado e implementado pelo governo em colaboração com as organizações não governamentais e iniciativas privadas. O efetivo bovino passou de cerca de 300.000 bovinos em 1994 para mais de 1.600.000 cabeças em 2008, sendo que destes, 53,6% se concentram na Região Sul de Moçambique (TIA, 2008). Contudo, este incremento na produção de ruminantes no país não foi acompanhado pela melhoria das condições higiênico-sanitárias nas diversas criações, o que proporcionou que ocorressem muitos casos de doenças de origem parasitária nos rebanhos, influenciando desta forma, a eficiência produtiva e reprodutiva dos rebanhos (MARTINS et al., 2008; TEMBUE et al., 2011a, b).

Dentre estas doenças, destacam-se aquelas transmitidas por carrapatos, que assumem uma grande importância devido ao elevado grau de morbidade e mortalidade, além de também ampliarem os gastos secundários aos criadores com tratamentos dos rebanhos e contratação de mão-de-obra especializada (MUGISHA et al., 2008; SIMUUNZA et al., 2011; TEMBUE et al., 2011a, b).

O sistema de produção pecuária no país deve ser entendido como um conjunto de tecnologias e práticas que incluem o manejo nutricional, sanitário e reprodutivo de cada espécie utilizada na criação, além da administração e gestão quotidiana de toda cadeia produtiva. Em relação à criação, a escolha de determinada raça ou grupamento genético, associado ao espaço geográfico onde a atividade pecuária será desenvolvida devem ser sempre levada em consideração.

Ao se definir um sistema de produção qualquer, os aspectos sociais, econômicos e culturais, também devem ser avaliados, pois estes fatores podem influenciar diretamente o processo produtivo da criação animal.

A pecuária do país tem como características a utilização de pastagens naturais sem suplementação de qualquer natureza aos animais, e que devido às condições climáticas da região, não conseguem suprir as exigências nutricionais dos rebanhos durante o tempo de estiagem.

A atual situação da pecuária moçambicana tem como agravante a baixa utilização de assistência veterinária atrelada à ausência de políticas governamentais claras promovendo desta forma, uma baixa produtividade no setor. Além disso, o que se observa é que muitos criadores não possuem acesso as informações sobre as atividades que desenvolvem, nem tampouco acesso a novas tecnologias para melhorar a produtividade da sua criação.

A atividade pecuária na Região Sul de Moçambique, independente do tamanho do rebanho e da sua localização, tem como principal característica a utilização de um sistema de produção tradicional, com baixa adoção de tecnologias no processo produtivo. Isto ocorre porque a produção animal em geral, é uma atividade complementar à atividade agrícola.

O conhecimento do perfil dos criadores de bovinos e a percepção destes sobre o tratamento e controle de doenças transmitidas por carrapatos podem elucidar formas e práticas de manejo dos animais, que constituem o entrave na melhoria da produtividade nas diferentes criações. Além disso, será possível explicar aos criadores sobre os fatores que interferem na produtividade de suas criações, o que poderá possibilitar a inclusão de novas práticas visando à melhoria da produção, e assim, tornando as criações mais rentáveis.

O presente estudo teve por objetivo avaliar o perfil dos criadores de bovinos, nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, sobre aspectos referentes às práticas de manejo, cuidados sanitários, controle de doenças transmitidas por carrapatos e gestão da atividade pecuária.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição do local de estudo

Foi realizado um estudo transversal descritivo sobre aspectos relacionados à criação de bovinos, por pequenos e médios criadores da Região Sul de Moçambique. Para isso, foram aplicados questionários investigativos com perguntas fechadas com o objetivo de obter informações sobre o processo produtivo pecuário realizado em cada criação nas diferentes comunidades participantes (HESTERBERG et al., 2007).

2.2 Questionário epidemiológico

Antes de qualquer coleta das amostras, os criadores e/ou seus representantes foram informados dos objetivos e a importância da pesquisa para o futuro da pecuária no país em geral e na Região Sul em particular.

Um questionário semi-estruturado foi elaborado e adequado para o presente estudo (THRUSFIELD, 2004), apêndice 1. As perguntas foram aperfeiçoadas de acordo com a realidade da pesquisa, maximizando a clareza e adição de alguns itens que pudessem auxiliar na obtenção de informações adicionais importantes. Foram escolhidos os temas e avaliados quanto à coesão dos mesmos. As questões foram abordadas com objetivo de obter informações sobre as características das criações envolvidas na pesquisa, o seu perfil e a percepção dos pequenos criadores do setor familiar da Região Sul de Moçambique sobre o processo produtivo, a percepção sobre a importância das doenças transmitidas por carrapatos, produção pecuária, sanidade animal e a forma como estes produtores controlam os ectoparasitos e seu nível de conhecimento sobre a biologia de carrapatos.

Os criadores, seus representantes ou gestores em cada local de coleta foram entrevistados por um único inquiridor para garantir uma padronização da abordagem e o máximo da imparcialidade. As perguntas foram redigidas em linguagem acessível, mesmo assim, durante a entrevista estas eram traduzidas na hora para a língua local e do domínio do entrevistado em cada província. Isso permitiu criar um ambiente agradável e de confiança ao entrevistado, fornecendo respostas com segurança, sem ambiguidade e de forma rápida e espontânea.

A aplicação destes questionários foi realizada com os criadores, gerentes e/ou seus representantes, nos tanques (imersão) ou corredores (pulverização) de tratamentos comunitários nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, na Região Sul de Moçambique.

Esta região possui uma área territorial de 170.558 km², com uma população humana de cerca de 4.785.916 habitantes (INE, 2007), caracteriza-se por possuir uma vegetação composta de savana aberta e gramínea palatável quase durante todo o ano e clima tropical úmido com duas estações bem distintas, verão e inverno. A agricultura praticada é de subsistência associada à pecuária sob o sistema de manejo extensivo.

A coleta de dados foi realizada no período compreendido entre os meses de Janeiro a Março de 2010, onde foram selecionados por conveniência 111 pequenos e médios criadores de bovinos em 11 comunidades dispersas e representativas entre as províncias avaliadas no presente estudo, apêndice 2.

2.3 Questões abordadas aos pequenos criadores

As questões abordadas nos questionários incluíram diversos aspectos relacionados aos criadores e as criações de bovinos na Região Sul de Moçambique.

Foram avaliadas as seguintes características nas criações: número de animais por criação, reposição dos animais, gestão diária da atividade pecuária, atividade principal do criador, manejo alimentar, reprodutivo e sanitário, sistema de criação, rotação de pastagem, limpeza das pastagens, assistência veterinária, mão-de-obra, número dos funcionários e pastoreio conjunto com outras espécies de animais.

Em relação aos criadores, destacaram-se algumas das seguintes características: nível de escolaridade, idade, experiência na produção, atualização sobre a atividade, diferença entre produção e produtividade.

Para avaliar a percepção dos criadores sobre a atividade pecuária, destacaram-se as seguintes questões: entraves na produção, principais doenças do rebanho, vacinações obrigatórias e outras vacinações do rebanho, parasitas mais importantes que acometam o rebanho, condutas perante doenças no rebanho, perspectivas futuras da criação e associativismo.

Neste estudo, também foi avaliado a percepção dos criadores em relação à biologia das principais espécies de carrapatos que acometem os bovinos na criação, além de avaliar a importância dada por eles aos agentes patogênicos transmitidos por carrapatos, abordando questões relacionadas aos prejuízos causados na criação animal.

Além destas questões, foram referenciados temas quanto à utilização de medicamentos tanto para o controle de carrapato, quanto para o tratamento de doenças por eles transmitidas, destacando também o período de aplicação, dose e utilização de equipamentos de proteção individual para funcionários.

2.4 Organização dos dados e análise

As respostas das perguntas no questionário eram do tipo fechado (sim ou não) e a partir da coleta dos dados, através de análise do conteúdo, estas respostas foram categorizadas de acordo com seu significado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado que do total de 111 criadores entrevistados, 33% (n = 37) das criações possuíam entre 1 a 5 animais, seguidos de 27% (n = 30) com 6-10 animais, 12,6% (n = 14) com 11-20 animais, 2,7% (n = 3) com 21-50 animais, 8,1% (n = 9) com efetivos superiores a 50 bovinos, apêndice 2.

Em relação à reposição dos animais, foi observado que 63,1% (n = 70) das criações utilizam o sistema fechado para a reposição de reprodutores, ou seja, apenas animais nascidos na própria criação (Tabela 1). Esta prática gera uma preocupação no futuro com relação à consanguinidade nos rebanhos. Por outro lado, os criadores que recorrem ao sistema aberto, através da compra em outras criações ou importação, estão prática também gera outra preocupação caso não sejam tomadas certas providências no sentido de evitar a introdução de enfermidades no rebanho.

A grande maioria das criações visitadas, 96,4% (n = 107) é administrada pelos próprios criadores e apenas 3,6% (n = 4) por gestores contratados.

A produção de bovinos de carne não é conduzida de forma empresarial por 100% (n = 111) dos criadores participantes na presente pesquisa. A não utilização do sistema de registro

de movimentos nas criações foi observada em 95,5% (n = 106) das criações visitadas. Com isso, torna-se difícil expressar com exatidão perdas e ganhos resultantes da produção pecuária, recorrendo-se sempre as estimativas, o que se reflete nas estatísticas oficiais do país.

Foi constatado que 93,7% (n = 104) das criações visitadas possuem além da produção pecuária, atividade agrícola e, apenas 4,5% (n = 5) das criações dedicam exclusivamente à pecuária. Na província de Maputo foi observado que 1,8% (n = 2) das criações visitadas dedicam-se a produção de bovinos e também a produção de reprodutores de melhor qualidade para venda. Outras atividades econômicas desenvolvidas juntamente com a produção pecuária foram observadas, como comércio de produtos diversos em 2,7% (n = 3) dos criadores.

Além da criação de bovinos foi verificada a criação conjunta com outras espécies de animais domésticos, como caprinos, ovinos, suínos e galináceos em 100% (n = 111) das criações. A presença de cães nestas criações foi relatada em 92% (n = 102).

Em relação à condição de criação, os bovinos e pequenos ruminantes dividem as mesmas pastagens, enquanto os suínos perambulam perto das casas nas comunidades, o que tem gerado conflito entre vizinhos devido aos estragos que os animais causam a propriedade alheia.

Na região estudada foi observado que o sistema de manejo extensivo é adotado em 100% (n = 111) das criações pesquisadas.

Entre as criações visitadas foi observada a ocorrência de diversos tipos de pastagens naturais, com maior relevância para *Panicum maximum* seguida por *Themeda triandra*, *Brachiaria decumbens*, *Cynodon dactylon*, entre outras. Com menor frequência foram encontrados: *Pennisetum purpureum* (Capim Elefante), *Cynodon* sp. (Tifton), *Cenchrus ciliaris* (Buffel Grass).

A prática de rotação das pastagens foi verificada em 1,8% (n = 2) das criações com base nas informações fornecidas pelos criadores. Importante foi verificar que 77,9% (n = 86) dos pequenos e médios criadores reconhecem a importância e a necessidade de maximizar a utilização das áreas de pastagens e o potencial existente para rentabilizar a atividade pecuária.

A produção de bovinos é mais elevada no verão devido à disponibilidade de pastagem natural durante a época chuvosa. Neste período, o caráter sazonal na abundância de alimento natural foi reportado por 99,9% (n = 111) das criações visitadas.

A eficiência reprodutiva tem relação direta com a eficiência produtiva do rebanho e consequentemente, o sucesso da atividade pecuária como um todo. Em relação a este quesito, apenas 3,6% (n = 4) das criações visitadas, realizavam o controle reprodutivo através de um processo seletivo das fêmeas e touros, do registro manual ou do sistema informático de todos os dados sobre movimentos na manada em fichas ou planilhas próprias.

Das quatro criações com este sistema de manejo, duas têm épocas de estação de monta natural definida e realizam pesagem mensal do rebanho em todas as classes (touro, boi, vaca, novilha, novilha, bezerro e bezerra). Na África do Sul, em propriedades de bovinos foi observado que um número muito menor de produtores realiza algum tipo de controle reprodutivo e de carrapatos (DE VOS, 1979).

A falta de registros de dados reprodutivos dificulta o acompanhamento da evolução da atividade não só para o criador, mas também para as autoridades governamentais responsáveis pela gestão e planejamento da pecuária nacional, provavelmente, devido a pouca conscientização e motivação dos criadores acerca da importância da contabilidade da atividade ou falta da orientação sobre os procedimentos metodológicos de sua execução.

Em relação à sanidade reprodutiva dos animais nas criações que empregavam como método reprodutivo a monta natural, observou-se que apenas 1,8% (n = 2) realizavam o teste de diagnóstico para brucelose, relacionado a isto, destaca-se que várias criações visitadas não possuíam um reprodutor (touro) próprio do rebanho, dependendo desta forma dos

reprodutores de outras criações nas pastagens comunitárias. Com isto, existe um alto risco de disseminação de doenças sexualmente transmissíveis no plantel.

Vale ressaltar também que muitos dos criadores que não realizam o controle da estação de monta no rebanho, favorecem o nascimento de muitos bezerros ao longo de todo o ano, o que predispõe a uma maior mortalidade nesta faixa etária, devido à carência alimentar. As vacas lactantes em plena época seca abandonam as crias e se não houver empenho dos funcionários estas crias acabam morrendo por inanição.

Em relação à assistência veterinária, 100% (n = 111) dos criadores entrevistados disseram ser assistidos por técnicos de extensão rural da rede pública dos Serviços Distritais das Atividades Econômicas (SDAE) e 1,8% (n = 2) das criações possuíam médicos veterinários permanentes nas criações Tabela 1.

No país não existem entidades autorizadas para o exercício da assistência veterinária privada salvo casos excepcionais em que o técnico é solicitado pelo criador para dar alguma assistência pontual e emergencial.

Nesse sentido, a assistência veterinária prestada aos pequenos criadores rurais pelos extensionistas agro-pecuários é considerada um fator de relevância por todos os entrevistados. Esta realidade muda em casos de ocorrência de surtos de doenças com mortalidades por causas desconhecidas ou abortos esporádicos onde a intervenção do médico veterinário das instituições públicas se faz presente para investigar as possíveis causas e fornecer as orientações técnicas necessárias.

De modo geral, os criadores se beneficiam frequentemente da assistência veterinária oferecida pelos técnicos da rede pública. Dentre os profissionais da agricultura mais solicitados pelos criadores, destacam-se os técnicos agro-pecuários para efeitos de intervenções curativas, as quais se refletem em efeitos significativos para a produção pecuária.

Dos 111 criadores entrevistados, 57,8% (n = 64) reconhecem a ocorrência de doenças transmitidas por carrapatos e a sua importância, além da necessidade do tratamento dos animais. Observou-se que 82,9% (n = 92) dos criadores reconhecem e apoiam a importância do cumprimento dos programas de vacinações obrigatórias como parte integrante do processo produtivo e da atuação dos técnicos da extensão rural veterinária nos tanques imersão e corredores de tratamentos (pulverização).

Das 111 criações visitadas, 95,5% (n = 106) declarou que o resultado da produção pecuária é destinado a subsistência familiar e a venda do excedente dos produtos agrícolas para incrementar a renda familiar, enquanto 4,5% (n = 5) tentam trabalhar em moldes comerciais.

Em relação à mão-de-obra, foi observado que 26,1% (n = 29) das criações visitadas possuem mão-de-obra contratada e 73,9% (n = 82) atuam com mão-de-obra exclusivamente familiar (Tabela 1). Nas criações visitadas com efetivo superior a 50 animais, 45% (n = 50) possuíam mão-de-obra assalariada.

Em relação ao número de trabalhadores por criação foi constatado que 27% (n = 30) das criações possuem de 1 a 2 empregados, sendo que esta relação aumenta quando o efetivo do rebanho também aumenta na criação.

Tabela 1. Características das criações de bovinos entrevistadas nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, 2010.

Variáveis analisados	Repostas em ordem de frequência					
	Primeira	%	Segunda	%	Terceira	%
Nº animais/propriedade	(entre 1 a 5)	33,0	(entre 6 a 10)	27,0	(entre 11 a 20)	12,6
Reposição de animais	Fechado ¹	63,1	Aberto ²	36,9	-	-
Gestão	Criador	96,4	Gerente	3,6	-	-
Atividade principal	Agro-pecuária	93,7	Comércio	6,3	-	-
Manejo Alimentar	Pasto verde	100,0				
Sistema de criação	Extensiva	99,1	Semi-intensiva	0,9	-	-
Rotação de pastagem	Não	99,9	Sim	0,9	-	-
Faz corretamente	Sim	1,8	Não	98,2	-	-
Limpeza das pastagens	Mecanica	1,8	Química	1,8	Não	98,2
Manejo Reprodutivo						
Controle reprodutivo	Não	96,4	Sim	3,6	-	-
Tipo de controle	Caderneta	96,4	Informatizado	3,6		
Método reprodutivo	Monta natural	100,0			-	-
Assistência veterinária	Extensionista	98,2	Veterinário permanente	1,8		
Mão-de-obra						
Tipo	Familiar	73,9	Contratada	26,1		
Nº funcionários	De três a quatro	31,5	Até dois	27,0	Mais de quatro	5,4
Pastoreio conjunto	Caprinos	67,6	Ovinos	11,7	-	-

¹Fechado: a reposição é feita a partir dos animais nascidos do próprio rebanho. ²Aberto: A partir da compra de animais de outras criações.

Em relação ao nível de escolaridade dos trabalhadores e criadores entrevistados, observou-se uma alta taxa de analfabetismo sendo de 93,7% (n = 96), (Tabela 2). Vale salientar que é considerado analfabeto em Moçambique aquele que não sabe ler nem escrever o seu próprio nome. O analfabetismo pode de alguma forma estar associado ao elevado percentual de criações em sistema rudimentar que não aplica o mínimo de tecnologias agro-pecuária.

Os criadores sem formação básica apresentam criações com baixa produtividade, em que muitos não obedecem a nenhum método de controle de carrapatos e não reconhecem sua importância.

Em contrapartida, a utilização de forma inadequada de carrapaticidas no rebanho pode levar ao desenvolvimento de algumas cepas a resistência aos medicamentos pelos artrópodes, e conseqüentemente, maiores casos de doenças transmitidas por carrapatos ao plantel (NOLAN, 1990)

O aumento do nível de escolaridade dos trabalhadores agro-pecuários poderia ampliar o aproveitamento dos recursos agro-ecológicos existentes em cada criação, aumentando desta forma, a rentabilidade e a produtividade. A cadeia produtiva de bovinos é responsável pela geração de postos de trabalho permanente, renda e tributos desempenhando um importante papel social.

Da mesma forma, a utilização de recursos tecnológicos modernos nas diferentes criações possibilitaria maiores ganhos e aumento da produtividade, resultando na continuidade da atividade em longo prazo, para as famílias dos criadores e conseqüentemente, diminuição do êxodo rural para áreas urbanas.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram as características dos criadores de bovinos e suas respectivas criações rurais, da Região Sul de Moçambique, gerando desta forma, uma base de conhecimentos para futuros estudos com ações direcionadas, tendo como foco na melhoria da produção e da produtividade deste subsetor. Estas ações poderiam aumentar a participação da região na produção pecuária do país. Contudo, existe a necessidade de uma interação efetiva entre o poder público e produtivo para promover essas melhorias no subsetor, em parceria com os criadores locais e o setor privado.

A respeito do uso de tecnologias em criações, deve-se levar sempre em consideração a realidade da produção e da produtividade de cada criação. Estes implementos devem ser incorporados de forma gradual, com adequação aos novos custos de produção.

A grande parte dos pacotes tecnológicos modernos sobre os conceitos de produção pecuária foram elaborados para os países economicamente avançados, portanto, sua aplicação em sistemas ambientais, sociais e econômicos distintos como as condições existentes na África Subsaariana requerem certos ajustes. Assim, faz-se necessário adequar às tecnologias a novas realidades conforme o nível de desenvolvimento das forças produtivas e capacidade econômica de cada um, ou de acordo com as características inerentes de cada região.

Assim, os estudos sobre as características das criações do setor de produção de carne bovina na Região Sul de Moçambique, considerando os diferentes estágios tecnológicos atingidos pelos seus criadores, podem contribuir ainda mais para o reconhecimento das dificuldades inerentes a este setor produtivo, suas limitações e assim permitir o planejamento das ações corretivas.

Em relação à faixa etária dos criadores entrevistados, foi observado que 94,6% (n = 105) têm mais de 25 anos de idade e em relação à escolaridade foi verificado que apenas 2,7% (n = 3) possuem o ensino básico completo (Tabela 2).

Tabela 2. Características dos criadores de bovinos entrevistados nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, na Região Sul de Moçambique, 2010.

Variáveis analisados	Respostas em ordem de frequência					
	Primeiro	%	Segundo	%	Terceiro	%
Idade em anos	> 25	94,6	≤ 25	5,4		
Escolaridade	Ensino básico	2,7	Ensino Médio	3,6	Sem escolaridade	93,7
Profissão	Agro-pecuário	54,1	mineiro	40,8	vendedor	5,1
Experiência (anos)	> 20	50,5	11-20	28,8	1-19	20,7
Atualização da atividade produtiva	Sim	42,3	-	-	-	-
Fonte de informação ¹	Produtores	82,0	Técnicos da extensão	53,0	-	-
Tema de preferência	Manejo geral	73,0	Reprodução	21,0	Alimentar	6,0
Produção e Produtividade	Não diferencia	96,4	Diferencia	3,6	-	-
Experiência familiar	Tradição familiar	29,7	1ª vez	70,3		

¹O entrevistado respondeu mais de uma opção.

O conhecimento da distribuição dos criadores quanto à faixa etária e nível de escolaridade é importante para adequação das abordagens técnicas e também do tipo de linguagem a ser utilizada em programas educacionais, de forma a permitir a absorção da informação por parte dos beneficiários de uma determinada região.

Dentre os criadores entrevistados foi verificado que 54,1% (n = 60) se consideram agro-pecuários de profissão, isto é, se dedicam a agricultura e pecuária para o seu sustento. Outras atividades referenciadas como principais foram: comércio de produtos diversos 27,9% (n = 31), sendo que destes 9,9% (n = 11) se declarou ser também líder comunitário, além de 1,8% de funcionários públicos que trabalham nas propriedades estatais. Tirando os funcionários públicos, todos os criadores entrevistados relataram que a produção de bovinos não é a sua única fonte de renda, ou seja, a atividade de criação de bovinos é caracterizada, nesta região, como uma atividade complementar ao sustento familiar dos criadores.

Um ponto importante que foi abordado nas entrevistas retrata o tempo de experiência dos entrevistados no setor pecuário. A esse respeito, foi observado que 29,7% (n = 33) dos entrevistados têm experiência de criação na família, 70,3% (n = 78) estão a criar pela primeira vez e segundo suas palavras, graças ao programa de repovoamento pecuário (Tabela 2).

Em relação à forma de atualização na área de atividade, o principal meio relatado pelos criadores foi através das conversas informais com outros criadores ou dos técnicos agro-pecuários dos Serviços Distritais das Atividades Econômicas. As lojas que comercializam produtos agro-pecuários foram citadas como fonte de informação por alguns criadores e outros relataram obter informações através dos criadores mais experientes. Esta situação reforça a necessidade de aumentar as ações dos técnicos agro-pecuários, principalmente dos serviços de extensão rural, sejam eles estatais ou das organizações não governamentais (ONG's) e a necessidade de cursos direcionados para aperfeiçoamento e treinamento dos produtores.

A forma com que os criadores buscam a sua atualização na área de atividade pode demonstrar certo descrédito e falta de confiança nas autoridades responsáveis pela gestão da pecuária nacional em geral.

Quando estes foram questionados sobre qual o tema de preferência na atualização da atividade pecuária, 73,0% (n = 81) disseram que buscam informações sobre o manejo higiênico-sanitário em geral do rebanho e tema como o manejo alimentar foi relatado por 27,0% (n = 30) dos entrevistados (Tabela 2).

Observou-se que 50,5% (n = 56) dos entrevistados apresentam mais de 20 anos de experiência no setor bovino, fato que pode estar relacionado a passagem da criação na forma de herança familiar, ou pelo surgimento de novos empreendedores no setor pecuário devido ao repovoamento pecuário iniciado na década de 90 (Tabela 2).

Foi constatado que 96,4% (n = 107) dos criadores não tem conhecimento sobre os conceitos de produção e produtividade, demonstrando, desta forma, que estes não gerenciam a sua produção pecuária como uma empresa rural, mas como um tipo de “prestígio social na comunidade”, sem se preocuparem com a rentabilidade, ou possíveis lucros com a criação de animais.

Em relação à percepção dos criadores sobre a atividade pecuária exercida por eles, observou-se que 49,5% (n = 55) consideraram como principal entrave da produção de bovinos, o custo/benefício da produção em relação aos criadores, seguida pela mão-de-obra, 38,7% (n = 43), qualidade das pastagens ao longo do ano 11,7% (n = 13) (Tabela 3). Outros fatores apontados como entraves para a produção pecuária foram a falta de priorização do setor pecuário, em particular, a falta de linha de crédito agrário com juros bonificados, o que dificulta uma melhor estruturação das criações pecuárias para superar as dificuldades da produção de bovinos e sua comercialização.

Estes resultados demonstram as questões importantes que envolvem a produção pecuária nas criações na Região Sul de Moçambique, e que são semelhantes na maioria dos países da África subsahariana, onde o setor familiar pratica a produção animal em moldes tradicionais (JONGEJAN et al., 1988; CHILONDA, et al., 1999).

Dentre as questões higiênico-sanitárias do rebanho, as doenças transmitidas por carrapatos foi o problema mais referenciado pelos criadores 78,4% (n = 87), (Tabela 3), seguida pelos processos pulmonares característicos de pneumonia 42,3% (n = 47). Oito vírgulas um por cento dos entrevistados também relataram a ocorrência de animais que urinavam sangue. Quando perguntados sobre a principal doença que acometia o rebanho, os criadores destacaram as doenças transmitidas por carrapatos, citadas por 87,4% (n = 97) dos criadores. Esta constatação demonstra a importância destas doenças na região estudada e a relevância de pesquisas e extensão veterinária sobre o assunto em análise.

O resultado do presente estudo disponibiliza novas informações que podem ser utilizadas para um novo direcionamento dos técnicos agro-pecuários que atuam a nível distrital, assim como para os gestores da pecuária do nível provincial e nacional, bem como para os pequenos criadores de bovinos de carne, também poderá facilitar o planejamento de programas estratégicos e práticas preventivas e de controle das diferentes espécies de carrapatos presente na região.

Em relação à prevenção de doenças no rebanho através da vacinação, observou-se que 100% (n = 111) dos criadores entrevistados disseram cumprir com as vacinações obrigatórias do rebanho para a Febre Aftosa, Carbúnculo Hemático, Sintomático e dermatose nodular, realizadas através das campanhas periódicas por entidades oficiais do governo, (Tabela 3). Importante ressaltar que as questões higiênico-sanitárias em relação às vacinações são iguais em todo o país, visto que as entidades governamentais são responsáveis pela compra distribuição e execução das vacinações obrigatórias.

No contexto das hemoparasitoses, a infestação por carrapatos foi a mais referenciada como sendo o principal problema 66,7% (n = 73) seguido pelas moscas hematófagos 22,7% (n = 25), (Tabela 3).

A importância que atribuída pelos criadores sobre a infestação por carrapatos pode estar relacionada à maior visualização dos ectoparasitas nos seus animais, o que contribuiu a ampliação da gravidade do problema por parte dos criadores.

Perguntados sobre qual é a sua conduta diante da ocorrência de animais com sinais de doença, foi verificado que 67,6% (n = 75) tentam resolver por conta própria, 28,8% (n = 32) chamam técnicos da extensão rural ou procuram ajuda aos criadores vizinhos mais próximos (Tabela 3).

Tabela 3. Percepção dos pequenos criadores de bovinos sobre a atividade pecuária nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, 2010.

Variáveis analisados	Respostas em ordem de frequência					
	Primeira	%	Segunda	%	Terceira	%
Entrave na produção ¹	Custo/benefício	48,8	Mão de obra	38,7	Alimentação	12,5
Principal doença	Anaplasmose e babesiose	78,4	Trypanosomiase	12,5	Diarreias	8,7
Vacinação	Obrigatórias e brucelose	100,0	-	-	-	-
Parasita mais importante	Carrapato	66,7	Mosca	22,7	gastrointestinais	10,7
Diante de um problema de saúde no rebanho	Empregado resolve	67,6	Proprietário resolve	28,8	Chama técnico da extensão	3,6
Perspectiva futura para o produtor de carne	Pessimista	63,1	Indiferente	24,3	boa	12,6
Tem associação de produtores de carne	Não	63,0	Não sabe	37,0	-	-

¹O entrevistado respondeu mais de uma opção

Com o objetivo de avaliar indiretamente a satisfação dos criadores de bovinos sobre o setor pecuário, estes foram questionados sobre sua perspectiva em relação ao futuro do pequeno criador de bovinos de carne na sua província e na Região Sul de Moçambique. As respostas foram: 64,0% (n = 71) dos entrevistados tiveram uma visão pessimista, contra 12,6% (n = 14) com uma boa perspectiva, e 24,3% (n = 27) se mostraram indiferentes, (Tabela 3).

Em relação a percepção dos criadores quanto a participação das associações ou Organizações Não Governamentais (ONGs) junto aos criadores, 63,1% (n = 70) responderam haver colaboração, dos quais 71,2% (n = 79) relataram assistência veterinária por extensionistas da rede das ONGs, 42,3% (n = 47) relataram ter se beneficiados de financiamentos através do Fundo Distrital de Desenvolvimento Local.

Perguntados sobre quais são os aspectos que a extensão rural deve melhorar em relação ao criador, 100% (n = 111) destacaram a assistência veterinária e o controle de carrapatos como pontos principais. O destaque dado pelos criadores entrevistados em relação a necessidade de melhorar a assistência veterinária reforça a importância das doenças

transmitidas por carrapatos e outros artrópodes, demonstrando que os próprios criadores acreditam que o conhecimento técnico e a sua aplicação na produção pecuária podem melhorar a sua condição econômica.

No cenário atual de Moçambique, com a economia de mercado e transformações tecnológicas, a busca por produtividade e qualidade do produto final se faz necessário. Aqueles que não se adaptarem a atual realidade, enfrentaram sérios problemas para se afirmarem e se tornarem competidores neste novo cenário de mercado de consumo cada vez mais exigente.

Em relação percepção dos criadores sobre a biologia dos carrapatos foi observado que 91,9% (n = 102) dos entrevistados relataram que a úbere, a região da virilha e anal, além do escroto são os locais mais afetados, seguido pelo pescoço 54,1% (n = 60), orelhas e axilas 7,2% (n = 8). Resultados semelhantes foram descritos por Rocha et al. (2006), que verificaram que as regiões da úbere, perianal, pescoço, cauda e barriga, axilas e virilha ou partes baixas são os locais dos bovinos mais infestados por carrapatos, (Tabela 4).

Tabela 4. Percepção dos pequenos criadores de bovinos entrevistados nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique sobre a biologia dos carrapatos, 2010.

Variáveis analisados	Repostas em ordem de frequência					
	Primeira	%	Segunda	%	Terceira	%
Região do corpo mais afetada ¹	Úbere	91,9	Pescoço	68,0	Orelhas	46,8
Causa da predileção	Não sabe	100,0	-	-	-	-
Tempo de vida parasitária	Não sabe	100,0	-	-	-	-
Tempo de vida nas pastagens	Não sabe	100,0	-	-	-	-
Estação do ano de maior incidência de carrapato	Tempo de chuva (Verão)	100,0	-	-	-	-
Número de ovos/fêmea	Não sabe	100,0	-	-	-	-
Nº espécies que parasitam bovinos	Não sabe	100,0	-	-	-	-
Estágios x Espécies	Espécies diferentes/ Não sabe	100,0	-	-	-	-
Animais mais resistentes a infestação por carrapatos	Sabe	100,0	-	-	-	-
Predadores ¹	Gavião	79,0	Outros pássaros	55,0	-	-

¹O entrevistado respondeu mais de uma opção.

No presente estudo, 100% (n = 111) dos criadores não souberam explicar a razão da predileção dos carrapatos por tais locais. Estes resultados diferem dos reportados por Rocha et al. (2006) em que os entrevistados responderam locais mais protegidos, 27,9% (n = 31) em função da pele, 16,2% (n = 18) por serem mais próximos do chão, 12,6% (n = 14) por ser

região de pêlo mais fino e diferem também por aparecerem outras respostas como região mais quente do corpo do animal ou fresca.

O conhecimento do ciclo biológico dos carrapatos envolvidos é importante para que o criador compreenda melhor as estratégias de seu controle e possa assim atuar nos momentos mais adequados. Questionados sobre o tempo de vida parasitária dos carrapatos, 100% (n = 111) dos criadores não souberam responder. Em relação ao tempo de vida dos carrapatos nas pastagens, 100% (n = 111) também disseram não saber. Em Minas Gerais os resultados obtidos por Rocha et al. (2006) sobre o desconhecimento dos criadores variaram entre 28% e 52% para tempo de vida parasitária e tempo de vida nas pastagens, respectivamente.

Todos os criadores responderam corretamente em relação a época do ano de maior incidência de carrapatos, o verão, o que difere da situação observada no Brasil em que maior incidência de carrapatos foi observada em duas épocas, seca e chuvosa (FURLONG, 1993; MENDES et al., 2008).

Em relação ao número de espécies de carrapatos que parasitam bovinos 100% (n = 111), afirmaram não souberem, mas nomear as mais frequentes como sendo estrela azul, marrou e marrou escuro em referência *A. hebraeum*, *R. appendiculatum* e *R. microplus* respectivamente (Tabela 4). Esta situação se manteve quando os criadores foram perguntados sobre a diferenciação entre espécies e estágios de desenvolvimento.

Perguntados sobre os predadores naturais dos carrapatos dos bovinos, 100% (n = 111) dos criadores disseram conhecer alguns e, dentre os predadores relatados destacaram o gavião carrapateiro, (Tabela 4). Este resultado demonstra a capacidade de observação dos pequenos criadores e que este conhecimento é bastante difundido na região estudada.

Os resultados obtidos no presente estudo a partir das respostas dos criadores sobre questões relacionados com a biologia dos carrapatos foram muito menos satisfatórios que os observados entre os produtores de bovinos no Brasil (ROCHA et al., 2006).

Foi observado que 100% (n = 111) dos entrevistados não souberam estimar sobre o número de ovos produzidos por fêmea de carrapato, por exemplo, de *Amblyomma hebraeum* ou *Rhipicephalus microplus*.

Os criadores moçambicanos demonstraram não conhecer a biologia dos carrapatos que infestam os seus animais, deste modo, torna-se difícil estabelecer um programa de controle eficaz. Esta situação se torna favorável ao uso indiscriminado dos produtos químicos carrapaticidas e, conseqüentemente, o desenvolvimento de carrapatos resistentes a certos princípios ativos. Contudo, neste estudo 100% (n = 111) dos criadores reconheceram que os bovinos de raça Nguni mais conhecido por (“malhado” ou “boca negra”) são a mais resistente a infestação por carrapatos do que quaisquer outras raças.

A importância dos carrapatos na sanidade dos rebanhos e produção pecuária foi relatada em 100% (n = 111) das criações visitadas e todos os criadores concordam que o parasitismo por ectoparasitas causa perdas na produção de carne e desvalorização do couro, entretanto, não sabem quantificar ou estimar estas perdas, (Tabela 5).

No Brasil, resultados semelhantes foram relatados em 100% dos produtores também acreditam que o parasitismo por *R. microplus* causa perdas na produção de carne e leite, que estas perdas podem variar entre 75 e 100% (ROCHA et al., 2006). As perdas na pecuária no Brasil foram quantificadas em mais de 500 milhões de dólares norte-americanos (GRISI et al., 2002).

Quando perguntados sobre de que formas os carrapatos dos bovinos podem causar prejuízos, os criadores destacaram as perdas diretas por morte devido as doenças transmitidas por carrapatos, perdas na qualidade do couro e indiretos devido a gastos secundários por aquisição dos antiparasitários.

Ao ser indagado sobre qual ou quais as doenças seriam transmitidas aos bovinos pelos carrapatos, 96,4% (n = 107) afirmaram ser “a malária dos bovinos” equivalente a tristeza

parasitária bovina no Brasil e, 3,6% (n = 4) dos entrevistados citaram as babesioses, anaplasmose, theileriose e ehrlichiose, (Tabela 5).

Os agentes etiológicos de tais doenças não são conhecidos por 96,4% (n = 107) dos entrevistados, mas os sintomas mais citados foram os seguintes: perda de apetite, isolamento do resto do rebanho, animais apáticos e tristes.

Tabela 5. Percepção dos criadores de bovinos entrevistados nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique sobre a importância de carrapatos na sanidade animal e no processo produtivo, 2010.

Variáveis analisados	Repostas em ordem de frequência					
	Primeira	%	Segunda	%	Terceira	%
Perdas diretas na produção de animais	Sim	100,0	-	-	-	-
Quanto de perda (%)	Não sabe	100,0	-	-	-	-
Outros prejuízos ¹	Doença	95,0	Couro	45,0	Moscas hematofágos	29,7
Mecanismo de causa morte ¹	Carrapatos	73,0	Mordedura de cobras	47,0	Não sabe	31,0
Doença transmitida por carrapatos aos bovinos ¹	“Malária” dos bovinos	96,4	Ehrlichiose	3,6	Outras doenças	3,6
Agentes etiológicos	Não sabe	96,4	Conhece	3,6	-	-
Sintomas de doença ¹	Perde apetite, isola-se dos outros	90,0	Palidez de mucosa, perda de produção de leite	3,6	Não sabe	6,4
Mortes no ano anterior	1-5	74,8	0,0	25,2		
Trata quando o animal está sem apetite ¹	Sim	89,0	Palidez de mucosa	6,3	Chama técnico da extensão	42,0

¹ O entrevistado respondeu mais de uma opção.

De uma maneira geral, os criadores da Região Sul de Moçambique demonstraram boa percepção dos prejuízos causados pelos carrapatos. Em relação ao conhecimento sobre as doenças transmitidas por carrapatos observaram-se que a maioria dos entrevistados desconhecia os possíveis agentes causadores e associada a esta informação, destaca-se a falta de diagnóstico destas enfermidades, que podem acabar influenciando negativamente o criador na escolha da droga apropriada a ser usada no tratamento dos animais acometidos e aliado a ausência de auxílio técnico adequado para este procedimento.

A falta de conhecimento dos criadores se refletiu não só no acompanhamento dos problemas sanitários dos seus rebanhos, mas também na falta de observação rotineira nos

animais. Este fato pode ser observado, quando estes não souberam responder sobre a ocorrência de casos de doenças no rebanho, mas apenas sobre a ocorrência de óbitos no plantel, provavelmente devido a alguma enfermidade.

Os criadores que responderam sobre a ocorrência de doenças nos seus rebanhos, informaram que a maior frequência ocorre em animais jovens e adultos importados.

Apenas 25,2% (n = 28) dos criadores disseram não terem ocorrido casos de doenças no rebanho a pelo menos um ano. Em relação à ocorrência de mortes nas criações no ano anterior ao do estudo, 74,8% (n = 83) reportaram ter ocorrido pelo menos uma morte no rebanho, cuja causa foi desconhecida. Estes dados podem estar subestimados, visto que 90,0% (n = 100) dos entrevistados afirmaram não conhecer os sinais clínicos específicos das doenças causadas por carrapatos, (Tabela 5). Vários criadores relatam que a carência alimentar no inverno torna os animais mais debilitados e com isso favorecem o aparecimento da doença.

Em relação ao momento que realizam o tratamento, 25,2% (n = 28) disseram aplicar o medicamento quando o animal está sem apetite e triste, 3,6% (n = 4) quando examinam as mucosas e percebem que estão pálidas e outros 61,3% (n = 68) disseram não saber. Vale salientar que, 97,3% (n = 108) dos entrevistados disseram receber assistência dos técnicos da extensão rural da rede pública ou dos outros criadores e 2,7% (n = 3) das criações tem médicos veterinários permanente nas propriedades.

Para o tratamento dos animais doentes 90% (n = 100) dos criadores não souberam responder corretamente que medicamentos deveriam usar em caso de suspeita de doença transmitida por carrapatos. Dentre os produtos citados, aqueles a base de Oxitetraciclinas foi referenciado por 6,4% (n = 7) e produtos a base de Dipropionato de Imidocarb por 3,6% (n = 4) (Tabela 6).

Todos os entrevistados afirmaram que a falta de diagnóstico dificulta a realização de um tratamento adequado e direcionado ao agente etiológico causador da doença, visto que a indicação dos produtos utilizados é dependente do correto diagnóstico do agente patogênico.

Tabela 6. Bases químicas e produtos comerciais utilizados pelos criadores de bovinos nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique para o tratamento de animais com suspeita de doenças transmitidas por carrapatos, 2010.

Bases químicas	Nomes comerciais®	Total	%
Oxitetraciclina ¹	Terramicina LA	7	6,4
Dipropionato de Imidocarb ¹	Imizol	4	3,6
Não conhece ¹	--	100	90,0

¹O entrevistado respondeu mais de uma opção.

Estes fatos sugerem que, apesar de todos os criadores considerarem os carrapatos um grande problema sanitário nas criações, nota-se que não há uma preocupação dos mesmos em conhecerem os carrapatos transmissores de agentes etiológicos responsáveis pelas enfermidades, para estabelecer um controle estratégico mais eficiente. O método mais empregado para aplicação dos produtos carrapaticidas é o banho por pulverização ou aspersão utilizado por 78,4% (n = 87) dos criadores, seguido pelos produtos *pour-on*, utilizado por 19,8% (n = 22), imersão é utilizado apenas por 18,5% (n = 6) dos criadores e medicamentos injetáveis por 1,8% (n = 2) dos criadores, (Tabela 7). Um fato curioso é que o produto *pour-on* é comprado diretamente na África do sul pelos criadores ou seus familiares. A bomba

costal foi o equipamento mais utilizado por 94,6% (n = 105) dos criadores entrevistados, (Tabela 7).

Bianchi et al. (2003) demonstraram que o intervalo entre as aplicações e o uso inadequado de produtos químicos para pulverização também podem favorecer a ocorrência da resistência nas populações de carrapatos.

Dos entrevistados, 29,7% (n = 33) afirmaram que só aplicam os produtos carrapaticidas quando eles conseguem visualizar os carrapatos nos animais infestados, 69,4% (n = 77) dos criadores disseram realizar o controle quinzenal, (Tabela 7).

Foi observado que 2,7% (n = 3) das criações fazem a escolha da concentração segundo orientação do fabricante, 94,6% (n = 105) se informam com vendedores e outros 1,8% (n = 2) com outros criadores, (Tabela 7). Aparentemente, os criadores de bovinos têm maior cuidado a respeito da dose no uso de produtos carrapaticidas, mas isto não significa dizer que eles possuem preocupação com resíduos dos produtos no ambiente. Foi observado que alguns corredores de tratamento estão mal localizados com relação à fonte de bebedouros, (Tabela 7).

No presente estudo, nenhum criador relatou o uso de concentração maior do que a indicada nas embalagens dos produtos carrapaticida. O uso de doses inferiores às recomendadas pelo fabricante também não foi relatado por nenhum produtor entrevistado, mas o uso indiscriminado dos produtos carrapaticidas é uma realidade e foi observada em vários locais.

Todos os criadores disseram tratar todos os animais com carrapaticida no mesmo dia. Também foi observado que 25,2% (n = 28) dos criadores pulverizam apenas áreas do corpo do animal que apresentam infestação de carrapatos e não ao corpo todo.

Um aspecto muito importante observado foi à correta contenção dos animais que permite a aplicação adequada do produto, embora não sejam cumpridas na íntegra as regras. A esse respeito foi verificado também que em 2,7% (n = 3) dos 11 locais onde as coletas foram realizadas, são usados corredores de concreto para a aplicação dos produtos, o que dificulta a aplicação da droga na parte ventral e axilas dos animais, locais preferenciais dos carrapatos.

Rocha et al. (2006) verificaram uma melhor situação neste aspecto em Minas Gerais, visto que 84% dos produtores faziam a contenção adequada dos animais para realização dos banhos carrapaticidas e 32% utilizavam mais de três litros por animal.

Entre os entrevistados, 2,7% (3/111) relataram fazer banhos carrapaticidas semanalmente, 26,1% (n = 29) em intervalo de 15 dias, 12,6% (n = 14) com intervalo de 21 dias, 10,8% (n = 12) mensalmente e 16,2% (n = 18) com intervalo de 2 meses, (Tabela 7). Nota-se aqui a falta de orientação técnica no controle de carrapatos, mesmo assim, é preciso considerar as diferentes realidades locais, bem como a base química utilizada e a eficiência da droga em uso com base em conhecimento científico e técnico, para que se tomem decisões adequadas quanto ao calendário a seguir no controle dos carrapatos em bovinos.

Foi perguntado aos criadores sobre quem aplica o produto carrapaticida e 94,6% (n = 105) responderam que são os empregados e em 5,4% (n = 6) os gestores. A maioria dos criadores, 98,2% (n = 109) disse não acompanharem a aplicação do carrapaticida e, 5,4% (n = 6) dos gestores acompanham aplicação das drogas, (Tabela 7). Esta situação demonstra claramente a falta de preocupação dos criadores em garantir o uso adequado dos medicamentos para que se obtenha um bom resultado. Isto pode favorecer a ocorrência de erros na preparação da solução carrapaticida ou mesmo na sua aplicação sobre os animais, este aspecto faz reaviver mais uma vez a importância dos encarregados dos tanques carrapaticidas no país.

Estes resultados mostram que os criadores aplicam os produtos carrapaticidas em função do grau de infestação e não considera nenhum critério técnico, o que resulta na realização de um número excessivo de banhos carrapaticidas, como também verificados por

Rocha et al. (2006). Neste sentido, perguntados sobre ações que podem favorecer o desenvolvimento de resistência a produtos carrapaticidas, 97,3% (n = 108) dos produtores não souberam responder e 2,7% (n = 3) disseram o uso contínuo ou subdose de um mesmo produto.

Dentre os criadores entrevistados, 100% (n = 111) disseram não ter como evitar o uso de qualquer produto carrapaticida, uma vez que eles usam qualquer produto que estiver no mercado e que tenham condições de comprar. Relataram que não tem preferências desde o produto funcione bem e mate os carrapatos.

Segundo Bianchi et al. (2003) o uso inadequado de produtos para pulverização também pode favorecer a resistência nas populações de carrapatos. A troca indiscriminada de produtos carrapaticidas sem critérios pode favorecer a seleção de populações resistentes de carrapatos aos produtos carrapaticidas utilizados simultaneamente (FURLONG; MARTINS, 2000). A variação de fatores como raça, condição corporal, idade e estado fisiológico dentro de determinadas criações devem ser consideradas como mais importante que entre propriedades (BIANCHI et al., 2003). Apesar da grande maioria dos criadores não acompanharem a aplicação dos produtos carrapaticidas, 95,5% (n = 106) afirmaram serem responsáveis na determinação do método de controle de carrapatos no seu rebanho. Quanto aos motivos para troca de produtos carrapaticidas, 97,3% (n = 108) relataram a perda da eficiência, ou por orientação dos técnicos da extensão rural ou em função do aparecimento de produtos mais baratos no mercado e 2,7% (n = 3) para evitar o desenvolvimento de resistência a determinado produto carrapaticida, (Tabela 7).

Com o objetivo de conhecer a satisfação dos criadores, estes foram perguntados se estavam satisfeito ou não pelo método de controle de carrapato empregado em suas criações. Dentre os 111 criadores entrevistados, 98,2% (n = 109) disseram não estar satisfeitos, mas, continuam criando porque faz parte da cultura da família senão teriam abandonado a atividade. Apesar desta aparente insatisfação, os criadores esperam melhoria na gestão dos tanques imersão comunitários onde a maioria dos criadores de bovinos leva os seus rebanhos para o controle de carrapatos na região. Nenhum criador se referiu ao resíduo do produto químico na carne, contaminação ambiental, processo de resistência e riscos de intoxicação.

Segundo Furlong (1993), deve-se ter em mente a não erradicação de carrapatos, mas sim a busca por um equilíbrio no controle que permita manter a imunidade contra os agentes causais das doenças transmitidas por carrapatos e minimização das perdas econômicas.

A respeito do controle estratégico de carrapatos e o desenvolvimento de resistência a produtos carrapaticidas, o presente estudo deixa claro a falta de conhecimento dos criadores sobre controle e a importância da pressão do uso dos acaricidas para seleção de cepas de carrapatos resistentes (KUNZ; KEMP, 1994).

Com relação à segurança durante a aplicação dos produtos, perguntou-se sobre os equipamentos de segurança e proteção individual que os criadores conheciam, sendo que apenas 5,4% (n = 6) citaram a máscara, luvas, óculos, botas de borracha e o macacão. No entanto, estes equipamentos não são utilizados e a justificativa dada é a falta de recursos para a sua compra dos mesmos, 94,6% (n = 105) disseram não conhecer nenhum equipamento de proteção a ser utilizado durante a aplicação de banhos carrapaticidas (Tabela 7). Estes resultados foram superiores aos observados no Brasil em Minas Gerais, onde apenas 28% dos produtores disseram não usar qualquer tipo de proteção (ROCHA et al., 2006), o que configura um sério risco para a saúde da pessoa exposta. Por outro lado, alguns dos entrevistados relataram terem se sentido mal pelo menos uma vez depois da aplicação do carrapaticida.

Tabela 7. Percepção dos criadores de bovinos entrevistados nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique sobre o controle dos carrapatos, 2010.

Variáveis analisados	Repostas em ordem de frequência					
	Primeira	%	Segunda	%	Terceira	%
Tipo de controle usado ¹	Banho	78,4	<i>Pour on</i>	19,8	Injetável	1,8
Equipamento utilizado ¹	Bomba costal	78,4	<i>Pour on</i>	19,8	-	-
Intervalo de aplicação do carrapaticida	Quinzenal	69,4	Muita infestação	29,7	-	-
Escolha da dose	Fabricante	94,6	Escolhe a dose	2,7	Vendedor	1,8
Animais são banhados todos no mesmo dia	Todos	100,0	-	-	-	-
Regiões do corpo animal banhadas ¹	Todo corpo	100,0	<i>Pour on</i>	39,0	Injetável	29,0
Contenção dos animais durante o banho	Sim	100,0	-	-	-	-
Animais banhados com 20L (5:1)	Não	100,0	11-20	26,0	>20	21,0
Intervalo entre os banhos (dias)	De 15 em 15	26,1	mensal	16,2	Semanal	2,7
Aplicação do carrapaticida	Funcionário	94,6	Produtor	18,0	Administrador	5,4
Acompanhamento durante os banhos	Nenhum	98,2	Produtor	26,0	Administrador	5,4
Motivo da mudança de produto	Perda da eficiência	87,0	Evitar resistência/ Indicação do vendedor	5,0	Produto mais barato	3,0
Causa de resistência ao carrapaticida ¹	Subdose	47,0	Uso contínuo	39,0	Não sabe	24,0
Resistência em sua propriedade	Sim	82,0	Não	18,0	-	-
Orientação no controle de carrapatos	O próprio criador	82,0	Vendedor	13,0	Técnico da extensão	5,0
Conhece Equipamentos de Segurança	Macacão	55,0	Máscara	25	Luva	20
Uso dos equipamentos	Não usa	87,0	Usa	13,0	-	-

¹O entrevistado respondeu mais de uma opção

A respeito das drogas carrapaticidas mais utilizadas pelos criadores entrevistados na região, predomina os produtos que associam piretróides com organo-fosforados. O Amitraz e a Cipermetrina foram às bases farmacológicas mais citadas pelos criadores e embalagens observadas nas criações, seguido de Ivermectinas, (Tabela 8).

Tabela 8. Produtos carrapaticidas utilizados pelos criadores de bovinos entrevistados nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, na Região Sul de Moçambique, 2010.

Bases Químicas	Nomes comerciais®
Associações	Flytion, Colosso, Controller e Cypermil
Lactonas	Abamectina, Ivomec e Master LP
Fosforado	Bernilene, Ectoplus, Diclorvós e Ectofós
Fipronil	Ciperpour e Top Line

Produtos químicos que estavam uso no período da coleta das informações

A falta de conhecimento, por parte dos criadores, sobre a biologia dos carrapatos e sobre o controle estratégico pode ser considerado um dos fatores determinantes do atual cenário na utilização dos carrapaticidas na região estudada. Mesmo que os criadores tenham um bom nível de conhecimento sobre tais aspectos, é preciso que estes percebam a importância da utilização do controle estratégico e práticas efetivas de controle de carrapatos com base em critérios técnicos.

No caso do presente estudo, a situação do banho carrapaticida deve ser trabalhada com intuito de adequar a proporção entre volume da suspensão e o número de animais a serem banhados, bem como a base química a ser utilizada. Há necessidade de que profissionais atuem junto aos criadores, com ações educativas e informativas quanto a práticas adequadas de controle dos ectoparasitas, o risco da utilização de produtos químicos tóxicos no rebanho de carne e uso obrigatório dos equipamentos de proteção individual.

Através do questionário investigativo, foi observado que, de uma forma geral em todas as criações visitadas que a profilaxia e o controle de carrapatos não era feito de forma adequado e que nos locais onde não havia uma organização entre os pequenos criadores a metodologia empregada para o controle de ectoparasitos variava de acordo com a conveniência de cada um. Há uma disparidade na utilização das bases químicas, contudo foi observada, maior utilização dos piretróides e organofosforados.

Quanto à periodicidade na aplicação dos produtos químicos carrapaticidas, também não existe um período definido para sua aplicação. Cada comunidade aplicava segundo o seu critério e necessidade, adotando o seu intervalo de aplicação, que variava de uma semana ou duas, conforme a abundância de carrapatos, segundo os entrevistados. Durante as coletas nas criações foi observada a infestação por carrapatos, em sua maioria, de todos os estágios (larvas, ninfas e adultos).

O objetivo da produção pecuária na maioria das criações não é gerar renda. A criação constitui uma satisfação social da maioria dos pequenos criadores, mesmos aqueles com efetivos superiores a 100 bovinos não foi observada uma organização administrativa que garantisse uma gestão em moldes comerciais, com a exceção de uma criação da província de Maputo, em que existe uma preocupação de rentabilizar a criação, faltando apenas uma assessoria técnica adequada para maior proveito da capacidade existente.

4 CONCLUSÕES

Ações educativas e de conscientização para os pequenos criadores sobre a importância das doenças transmitidas por carrapatos, do uso adequado de produtos químicos e da preservação do meio ambiente e proteção individual se fazem necessários;

Foi observada uma baixa percepção sobre a biologia das espécies de carrapatos, assim como dos possíveis agentes patogênicos transmitidos por estes artrópodes pela maioria dos criadores entrevistados;

A falta de diagnóstico adequado dos agentes transmitidos por carrapatos na região estudada é um fator que favorece ao uso indiscriminado de drogas terapêuticas e compromete a eficiência do tratamento.

CAPÍTULO II

PREVALÊNCIA SOROLÓGICA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Babesia bigemina* E *Babesia bovis* E FATORES ASSOCIADOS EM BOVINOS NA REGIÃO NO SUL DE MOÇAMBIQUE

RESUMO

A babesiose bovina é uma enfermidade causada por *Babesia* spp., um protozoário transmitido por carrapatos da família Ixodidae, sendo uma doença de importância econômica para bovinos nos trópicos. Em Moçambique é transmitida por carrapatos das espécies *Rhipicephalus microplus*, *R. decoloratus*, *R. everts everts* e *Hyalomma marginatum rufipes* e causada principalmente por *B. bigemina* e *B. bovis*. A doença caracteriza-se por apresentar altas taxas de morbidade e mortalidade nos países de clima tropical e subtropical, e está disseminada na Região Sul de Moçambique, onde a maioria dos rebanhos é composto de bovinos importados dos países vizinhos. O presente estudo teve como objetivo investigar as variáveis sexo, idade e origem geográfica como fatores de risco associados a prevalência sorológica e diagnóstico molecular de *B. bigemina* e *B. bovis* em bovinos nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, através das técnicas do ensaio de imunoabsorção enzimática indireto (ELISA-i) e a reação em cadeia de polimerase (PCR). Um total de 809 e 240 amostras de sangue de bovinos com e sem anticoagulante foram colhidas aleatoriamente nas províncias e analisadas simultaneamente pelo ELISA-i e PCR. A prevalência geral de *B. bigemina* e *B. bovis* foi de 71,8% (n = 581) e 76,6% (n = 620) pelo ELISA-i e 11,3% (n = 27) e 37,1% (n = 89) na PCR, respectivamente. Diferenças significativas nas duas infecções foram observadas em função da idade e origem geográfica das amostras. Os resultados da presente pesquisa fornecem informações valiosas sobre a epidemiologia da infecção por *B. bigemina* e *B. bovis* em bovinos na região estudada, que poderá ser usada pelos gestores da pecuária nacional no planejamento de futuras intervenções em programas de controle desta doença.

Palavras-chaves. *Babesia bovis*, *B. bigemina*, bovinos, epidemiologia, Moçambique

ABSTRACT

Bovine babesiosis is a disease caused by *Babesia* spp., a protozoan transmitted by ticks of the Ixodidae family, being a disease of economic importance for cattle in the tropics. In Mozambique it is transmitted by ticks of the species *Rhipicephalus microplus*, *R. decoloratus*, *R. everts everts*, and *Hyalomma marginatum rufipes* and mainly caused by *B. bigemina* and *B. bovis*. The disease is characterized by presenting high rates of morbidity and mortality in countries of tropical and subtropical climates, and is widespread in southern Mozambique, where most livestock is made up of beef cattle imported from neighboring countries. This study aimed to investigate gender, age and geographical origin as risk factors associated with serological prevalence and molecular diagnostic of *B. bigemina* and *B. bovis* in beef cattle in the provinces of Maputo, Gaza and Inhambane, southern Mozambique, through indirect enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA) and polymerase chain reaction (PCR). A total of 809 and 240 blood samples from cattle were randomly collected and analyzed simultaneously by i-ELISA and PCR. The overall prevalence of *B. bigemina* and *B. bovis* was 71.8% (n = 581) and 76.6% (n = 620), by i-ELISA and 11.3% (n = 27) and 37.1% (n = 89) by PCR test, respectively. Significant difference in the two infections was observed according to age and geographical origin of the samples. The results of this research provide valuable information on the epidemiology of infection with *B. bigemina* and *B. bovis* in beef cattle in the region studied, which can be used by domestic livestock managers in planning future interventions in this disease control programs.

Key words. *Babesia bovis*, *B. bigemina*, cattle, babesiosis, epidemiology, Mozambique

1 INTRODUÇÃO

A babesiose bovina é uma doença causada por parasitas hemoprotozoários do gênero *Babesia*, representados por *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* os quais são transmitidos por carrapatos. Essa doença é caracterizada por altas taxas de morbidade e mortalidade (McCOSKER, 1981). *B. bigemina* e *B. bovis* são conhecidas como sendo as espécies mais importantes porque são altamente prevalentes em regiões tropicais e subtropicais e por causar enormes prejuízos econômicas na pecuária (BOCK et al, 1997; 2004). Embora *B. bigemina* e *B. bovis* sejam filogeneticamente relacionadas e transmitidas pelos carrapatos *Rhipicephalus microplus*, *R. decoloratus*, *R. everts everts* e *Hyalomma marginatum rufipes* (DE MATOS, 2008), causam doenças notavelmente, diferentes em bovinos (BOCK et al, 2004).

A infecção por *B. bovis* é geralmente mais grave e resulta em maior mortalidade entre os animais susceptíveis, provavelmente, devido a capacidade de eritrócitos parasitados aderirem em microcapilares dos rins, pulmões e cérebro, com consequente falência de órgãos e choque sistêmico (UILENBERG, 2006).

Os animais que se recuperam de infecção aguda tornam-se portadores assintomáticos, servindo como reservatórios para infecção de carrapatos vetores (BOCK et al., 1997; 2004). Assim, a detecção de animais portadores e o diagnóstico diferencial entre *B. bigemina* e *B. bovis* é de fundamental importância para o manejo sanitário e adoção de medidas de controle estratégico (DE VOS; POTGIETER, 1983).

Tradicionalmente, a babesiose é diagnosticada pela identificação dos parasitas através do exame microscópico do esfregaço de sangue corados com *Giemsa*, no entanto, este método não é suficientemente sensível para detectar os parasitas na fase subclínica ou crônica da doença.

Recentemente, com advento de técnicas moleculares baseadas na detecção de ácidos nucleicos através da reação em cadeia da polimerase (PCR) demonstraram maior sensibilidade e especificidade em relação aos testes de diagnóstico tradicionais já existentes (FAHRIMAL et al, 1992; FIGUEROA et al, 1993a).

Por outro lado, os testes sorológicos, incluindo o teste de ensaio imunoabsorção enzimático indireto (ELISA-i) é capaz de detectar os anticorpos da classe IgG em animais portadores e, portanto, são frequentemente usados em estudos soropidemiológicos envolvendo maior número de amostras (BÖSE et al., 1990). Consequentemente, uma metodologia de combinação ELISA-i/PCR constitui uma poderosa ferramenta para pesquisas epidemiológicas com alta precisão no diagnóstico das infecções por *Babesia* spp.

Em meados da década de 1990 o governo da república de Moçambique aprovou e implementou um programa de repovoamento pecuário tendo como base a importação de bovinos dos países vizinhos notadamente, das República da África do Sul e do Zimbábue (MARTINS et al., 2008).

No entanto, este incremento na produção de ruminantes no país não foi acompanhada pela melhoria das condições higiênico-sanitárias nas criações, o que proporcionou a ocorrência de diversas doenças infecciosas. Dentre estas o destaque vai para aquelas transmitidas por carrapatos, tais como, babesiose, anaplasmosse, ehrlichiose e theileriose, as quais influenciaram negativamente a eficiência produtiva e reprodutiva dos rebanhos causando mortalidade acima de 50% dos animais na sua maioria importados (MARTINS et al., 2008; SIMUUNZA et al., 2011; TEMBUE et al., 2011a).

Moçambique é um país que tem como base do seu desenvolvimento o setor agrário, onde mais de 80% da população do país presta as suas atividades econômicas, porém a pecuária tem encontrado entraves devido a alta ocorrência de doenças transmitidas por carrapatos em particular a babesiose bovina (MARTINS et al., 2008; TEMBUE et al., 2011a). A produção pecuária representa uma importante fonte de satisfação das necessidades

alimentares numa parcela significativa da população moçambicana em carne, leite e outros derivados de origem animal, além de ajudarem nos trabalhos de campo como na lavoura, transporte de pessoas e mercadorias diversas através de tracção animal, também constitui a principal reserva monetária das famílias rurais de baixa no país Tembue (2011)³.

Devido a convivência humana juntamente com os bovinos, estes constituem a principal fonte de infecção para carrapatos e estes por sua vez podendo infectar os seres humanos (MAHONEY, 1975, MAHONEY; ROSS, 1972).

No entanto, informações sobre a prevalência de babesiose em bovinos são escassas em Moçambique, portanto, a investigação sobre levantamentos epidemiológicos da babesiose bovina é benéfica para obter informações que possa servir de subsídio para os gestores da pecuária nacional, além de fornecer informações que possam auxiliarem na redução das perdas económicas à pecuária.

O presente trabalho teve como objetivo investigar as variáveis sexo, idade e origem geográfica como fatores de risco associados a prevalência sorológica e molecular de *B. bigemina* e *B. bovis* em bovinos nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, através das técnicas do ensaio de imunoadsorção enzimática indireto e a reação em cadeia de polimerase.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Diagnóstico sorológico

Para a realização do teste de ensaio de imunoadsorção enzimática indireto (ELISA-i) para *B. bigemina* e *B. bovis* foram seguidas as padronizações descritas por Madruga et al. (2001), com pequenas modificações. No teste foram utilizadas microplacas de fundo plano (Costar 3590, Corning[®], USA) de 96 orifícios, sendo adicionados 100µL/poço de antígeno⁴ solúvel diluído em sua concentração ótima de reatividade (5µg/mL para *B. bigemina* e 20µg/mL para *B. bovis*) em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05 M e pH 9,6. Após incubação, durante 12 horas em câmara úmida a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por cinco lavagens consecutivas com tampão PBST 0,01 M pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBST20).

As placas foram bloqueadas com PBST20, acrescido de 5% de leite em pó desnatado Molico e incubadas em câmara úmida em estufa a 37°C, por uma hora, findo este período foram feitas lavagens novamente como anterior para remoção do agente bloqueante. Foram adicionados, em duplicata, 100µL por poço os soros testes e soros de referência positiva e negativa, na diluição de 1:800 em PBST20. As micro-placas foram incubadas por 60 minutos a 37°C em câmara úmida e a seguir, lavadas conforme descrito anteriormente.

Foram adicionado 100µL/poço do conjugado anti-IgG bovina acoplado a peroxidase (Sigma Chemical[®]) na diluição de 1:10.000 em PBST20 incubados durante 30 minutos a 37°C em câmara úmida e em seguida foram feitas novamente lavagens como supracitado. Em seguida, foi adicionado 50µL/poço do substrato revelador do teste, ortofenil-enodiamina (Fast-OPD; Sigma Chemical[®]) diluído em água destilada, e incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente do laboratório. A reação enzimática foi parada pela adição de 100µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2,5N, e as microplacas foram lidas em

³ Comunicação pessoal

⁴ Gentilmente cedidos pelo Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Gado de Corte-MS).

espectrofotômetro multicanal para microplacas de 96 orifícios (Labsystems iEMS Reader MF) sob comprimento de onda de 492nm.

A atividade imunológica de cada soro testado foi calculada mediante a determinação do valor com nível de confiança de 99,5%, segundo metodologia descrita por Frey et al. (1998).

Para corrigir o efeito da variação das densidades ópticas (DO) obtidas com a leitura de cada placa testada, a média das densidades ópticas de cada placa foi multiplicada por 100 e dividido pelo *cutoff* (média das DO dos soros testes x 100/*cutoff*). O resultado de cada soro teste foi expresso na forma de Índice de Densidade Óptica (IDO).

2.2 Diagnóstico molecular

2.3.1 Extração de ácido desoxirribonucléico (DNA)

A extração do DNA foi realizada a partir das amostras com sangue total contendo EDTA como anticoagulante utilizando o método de fenol-clorofórmio conforme protocolo descrito por Sambrook et al. (1989) com pequenas modificações (Anexo A).

A concentração do DNA obtido de cada amostra foi quantificada por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop®.

Em seguida o material foi acondicionado em freezer de -20°C até a realização dos testes moleculares. Para a tristeza parasitária bovina do total das amostras extraídas foram utilizadas para as reações da PCR, 240 amostras num total de 80 amostras por agente. O cálculo das amostras foi feita de forma proporcional e estratificado por local de coleta usando a mesma metodologia que foi usado para o cálculo do tamanho da amostra segundo a equação descrita por Sampaio (2002).

2.3.2 Obtenção de DNA dos controles positivos

Para *Babesia bigemina* e *B. bovis*, o DNA controle positivo foi produzido por inoculação experimental de bezerros esplenectomizados no Laboratório de Protozoologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)⁵

2.3.3 Determinação da sensibilidade analítica das reações

A sensibilidade analítica da reação para *B. bigemina* e *B. bovis* foi avaliada por meio de diluições seriadas de um DNA positivo do animal com parasitemia conhecida. Para este objetivo, foi feito primeiramente o cálculo da parasitemia em lâmina (IICA, 1987) e hematimetria de um animal positivo para cada agente. Desta forma, foram realizados esfregaços sanguíneos em lâmina, com sangue obtido por punção da veia jugular e contagem do número de hemácias em câmara de Neubauer.

A lâmina foi levada ao microscópio óptico e três campos foram examinados para fazer uma média do número de hemácias por campo. Posteriormente, foi determinado o percentual de parasitemia por meio da contagem dos parasitos por campo, somando aproximadamente 863 e 22815 hemácias para *B. bigemina* e *B. bovis* respectivamente. Considerando o resultado da hematimetria, foi obtida uma estimativa do número de parasitos por microlitro de sangue.

Após a obtenção do valor da parasitemia e considerando o volume de 200µL de sangue utilizado para extração de DNA, o volume de DNA que foi obtido ao final da extração

⁵ Gentilmente cedido pelo Laboratório de Protozoologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

100µL e o volume de DNA usado para fazer a reação de sensibilidade da PCR 1µL, foram estimados a capacidade de detecção da técnica por meio de diluições seriadas 1:10 do DNA positivo em água ultrapura DEPC (Treated water pyrogen free, DNase/RNase free, Cat. №75-0024, Lot. № 450263, USA).

2.3.4 A reação de amplificação

Os pares de oligonucleotídeos utilizados foram baseados na sequência do gene SS rRNA de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*. Os quais codificam para a sequência de DNA da região 18S rRNA, (número de acesso no GenBank: X59604) para *B. bigemina* e (número de acesso U06105) (LINHARES et al., 2002) e que flanqueiam um fragmento espécie específico de 458 e 541 pares de bases respectivamente.

Foram utilizados como *primers* os oligonucleotídeos seguintes:

Primers (iniciadores) de *Babesia bigemina* (produto de 458 pares de bases).

{ GAU5Forward (5'- TGG CGG CGT TTA TTA GTT CG-3')
{ GAU8Reverse (5'-GCC AGC GAA AAG ACC CAA C-3')

Primers (iniciadores) de *Babesia bovis* (produto de 541 pares de bases).

{ GAU9Forward (5'-CTG TCG TAC CGT TGG TTG AC-3')
{ GAU10Reverse (5'-CGC ACG GAC GGA GAC CGA-3'),

No teste da sensibilidade para a PCR foi utilizado um Master mix universal e a intensidade das bandas apresentaram um decréscimo regressivo conforme ia diminuindo a concentração do DNA positivo mediante as diluições seriadas. Foi utilizado à concentração de 0,25µM e 0,125µM de primers para *B. bigemina* e *B. bovis* respectivamente conforme descrito por Linhares et al. (2002). Além disso, em função do surgimento de amplificações inespecíficas foi realizada uma PCR touchdown.

As reações da amplificação para *B. bigemina* foram realizadas em um volume total de 25µL, empregando-se a seguinte mistura: 18,625µL de água ultra pura; 2,5µL de tampão (10x); 0,75µL de MgCl₂(50mM); 0,5µL de dNTP (10mM); 0,25µL para cada iniciador [primer Forward (20µM); primer Reverse (20µM)]; 0,125µL de platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 2µL de DNA da amostra teste.

As amplificações foram processadas em um termociclador Mastercycler gradiente, marca Axygen®, com um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos de desnaturação; 40 ciclos de 57,2°C por 30 segundos de anelamento; 40 ciclos de 72°C por 60 segundos de extensão e 1 ciclo de 72°C por 5 minutos da extensão final.

As reações da amplificação para *B. bovis* foram realizadas também em um volume total de 25µL, empregando-se a seguinte mistura: 18,625µL de água ultra pura; 2,5µL de tampão (10x); 1µL de MgCl₂(50mM); 0,5µL de dNTP (10mM); 0,125µL para cada iniciador [primer Forward (20µM); primer Reverse (20µM)]; 0,125µL de platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 2µL de DNA da amostra teste.

As amplificações foram processadas em um termociclador Mastercycler gradiente, marca Axygen®, com um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos de desnaturação; 40 ciclos de 59,3°C por 30 segundos de anelamento; 40 ciclos de 72°C por 60 segundos de extensão e 1 ciclo de 72°C por 5 minutos da extensão final.

Os mixes para as reações da PCR foram preparadas em fluxo laminar (Trox® Technik), previamente descontaminado com luz ultravioleta por 15 minutos.

2.4 Eletroforeses de DNA em gel de agarose

As preparações de DNA das reações de amplificação foram submetidas à eletroforese horizontal, em gel de agarose 1% contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo, em tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato, 2mM EDTA pH 8,0).

Um volume de 10µL de cada amostra, acrescido de 2µL de tampão de amostra azul bromofenol foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada a 90V por 1 hora e para a determinação do tamanho dos produtos amplificados, foi utilizado um marcador de peso molecular de 1kb ladder, Ludwig. Os produtos da PCR foram visualizados e fotografados em transluminador de luz ultravioleta acoplado a um aparelho analisador de imagens (L PIX TOUCH).

2.5 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados, as amostras dos animais foram agrupadas em diferentes categorias: faixa etária (< 12 meses, > 12 a ≤ 24 meses, > 24 a ≤ 36 meses e > 36 meses), sexo (macho e fêmea) e origem geográfica (Maputo, Gaza e Inhambane). Foram feitas duas análises estatísticas diferentes.

Na primeira, foi feita uma triagem da positividade das variáveis independentes pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ou exato de Fisher a nível de significativa de 5%. Todas aquelas variáveis que apresentaram associação significativa foram incluídas numa nova análise de regressão logística para construir um modelo multivariado.

O modelo multivariado de regressão logística foi aplicado para análises dos resultados sorológicos nas variáveis independentes (faixas etárias e origem geográfica das amostras) em função do resultado sorológico. Para este propósito os resultados foram analisados em nível dicotômico qualitativo (negativo = 0 e positivo = 1).

As razões de chances ou *Odds Ratio* (OR) foram calculados para as variáveis independentes que apresentaram significância estatística no teste χ^2 . Também foi utilizado o teste de McNemar para cálculo do χ^2 dos pares discordantes entre o teste de ensaio de imunoabsorção enzimático indireto (ELISA-i) e a reação em cadeia de polimerase (PCR). Todas as análises foram realizadas usando-se o programa estatístico e computacional Rstudio e BioEstat, versão 4.0 (AYRES et al., 2000).

3 RESULTADOS

Um total de 809 amostras de sangue de bovinos foram colhidas aleatoriamente nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique e analisadas simultaneamente pelo teste de imunoabsorção enzimático indireto (ELISA-i) e reação em cadeia da polimerase (PCR).

A detecção de anticorpos anti-*B. bigemina*, *B. bovis* e infecção mista foi de 71,8% (n = 581), 76,6% (n = 620) e 66,1% (n = 535) pelo teste de ELISA-i, respectivamente. Os resultados das análises através do teste de ELISA-i foram avaliados e agrupados segundo os fatores associados estudados, (Tabela 9). Diferenças significativas foram observadas em alguns dos fatores analisados no teste χ^2 (p<0,05). No que se refere a faixa etária, os animais jovens com menor de 12 meses de idade apresentaram menor taxa de infecção por *B. bigemina* e *B. bovis* estudados quando comparados com os animais mais velhos (p<0,05), o que demonstra menor exposição aos agentes estudados neste grupo etário, (Tabela 9).

O teste de sensibilidade da PCR para *B. bigemina* e *B. bovis* apresentou uma parasitemia de 0,01% e 0,5% ou $8,63 \times 10^4$ e $2,28 \times 10^3$, células parasitadas/µL de sangue, para

B. bigemina e *B. bovis*, respectivamente segundo protocolo padronizado por Linhares et al. (2002). O teste de diluição seriada apresentou uma sensibilidade inicial até a diluição 10×10^5 e 5×10^4 , o que significa um limite de detecção de *B. bigemina* e *B. bovis* de aproximadamente duas células parasitadas/ μL de sangue, respectivamente (Figuras 6 e 7).

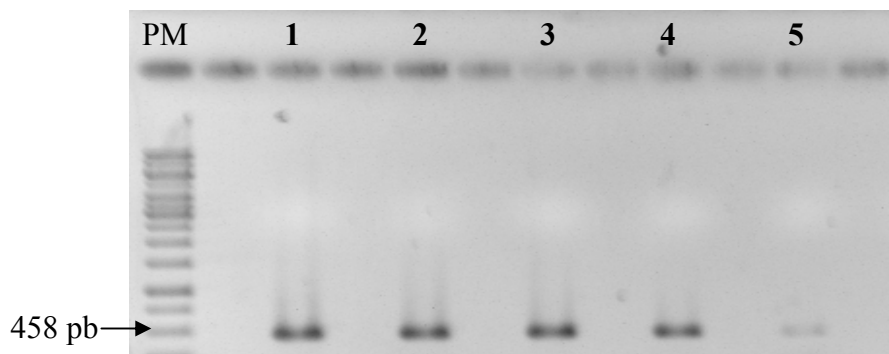


Figura 6. Limite de detecção de DNA de *B. bigemina* pela PCR, em amostras de sangue de bovinos experimentalmente infectados, procedentes da Universidade Federal de Minas Gerais. PM– Peso molecular 1kb (Ludwig); Linha 1 - $8,63 \times 10^4$ células parasitadas/uL, Linha 2 - $8,63 \times 10^3$ células parasitadas/uL, Linha 3 - $8,63 \times 10^2$ células parasitadas/uL, Linha 4 - $8,63 \times 10^1$ células parasitadas/uL, Linha 5 - $8,63 \times 10^0$ células parasitadas/uL. A seta indicativa da banda de 458 pb correspondente ao produto de amplificação de *B. bigemina*. A análise foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE pH 8,0, contendo brometo de etídeo 0,5mg/mL.

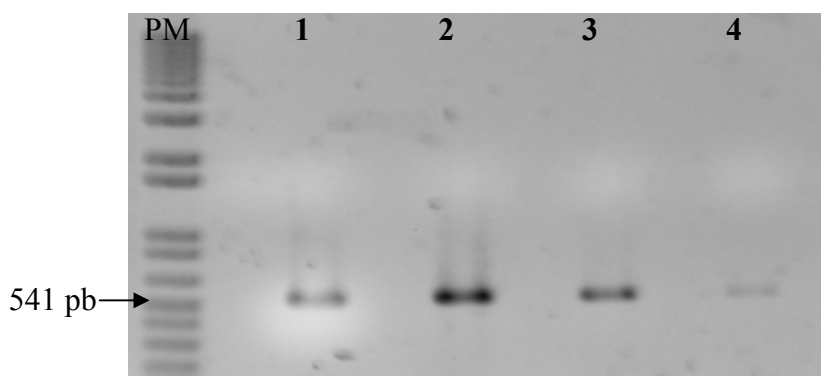


Figura 7. Limite de detecção de DNA de *B. bovis* pela PCR, em amostras de sangue de bovinos experimentalmente infectados, procedentes da Universidade Federal de Minas Gerais. PM– Peso molecular 1kb (Ludwig); Linha 1 - $2,28 \times 10^3$ células parasitadas/uL, Linha 2 - $2,28 \times 10^2$ células parasitadas/uL, Linha 3 - $2,28 \times 10^1$ células parasitadas/uL, Linha 4 - $2,28 \times 10^0$ células parasitadas/uL. A seta indicativa da banda de 541 pb correspondente ao produto de amplificação de *B. bovis*. A análise foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE pH 8,0, contendo brometo de etídeo 0,5mg/mL.

Tabela 9. Prevalência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e co-infecção em bovinos detectado pela reação de imunoadsorção enzimático indireto e fatores associados nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, 2010.

Variáveis	N	<i>Babesia bigemina</i>		<i>Babesia bovis</i>		<i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i>	
		n	%	n	%	n	%
Prevalência	809	581	71,8	620	76,6	535	66,1
Idade (meses)							
< 12	114	51	44,7 ^a	58	50,9 ^a	45	39,5 ^a
> 12 a ≤ 24	115	92	80,0 ^b	96	83,5 ^b	85	73,9 ^b
> 24 a ≤ 36	118	93	78,8 ^b	97	82,2 ^b	89	75,4 ^b
> 36	462	345	74,7 ^b	369	79,9 ^b	316	68,4 ^b
Sexo							
Fêmeas	495	357	72,1 ^a	379	76,6 ^a	333	67,3 ^a
Machos	314	224	71,3 ^a	241	76,8 ^a	202	64,3 ^a
Províncias							
Maputo	175	148	84,6 ^A	147	84,0 ^A	117	66,9 ^A
Inhambane	184	142	77,2 ^A	138	75,0 ^B	131	71,2 ^A
Gaza	450	291	64,7 ^B	335	74,4 ^B	287	63,8 ^A

N = número de amostras coletadas por fator, n = número de amostras positivas para *Babesia bigemina* e *B. bovis*. Valores da mesma coluna seguidos da mesma letra não apresenta diferença significativa entre os fatores estudados pelo teste de χ^2 ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

Bovinos infectados por *B. bigemina* e *B. bovis* foram encontrados em todas as províncias estudadas. Ao avaliar as amostras conforme a origem geográfica como um fator de risco associado à soropositividade, observou-se diferença significativa entre as províncias no teste χ^2 ($p < 0,05$), (Tabela 9). A taxa de prevalência de animais sororeagentes positivos para *B. bigemina* e *B. bovis* foi mais alta na província de Maputo.

As razões de chances para os bovinos de diferentes faixas etárias e origem geográfica para a *B. bigemina* e *B. bovis* estão representadas nas (Tabelas 10 e 11), respectivamente.

Tabela 10. Análises da regressão logística das variáveis independentes em relação ao teste de ensaio de imunoadsorção enzimático indireto, para a *Babesia bigemina* em bovinos nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, 2010.

Variáveis independentes	N	<i>Babesia bigemina</i>				
		n	%	OR	IC a 95%	p-valor
Idade (meses)						
< 12	114	51	44,7	1		
> 12 a ≤ 24	115	92	80,0	4,98	[2,76 a 8,99]	0,000
> 24 a ≤ 36	118	93	78,8	4,77	[2,67 a 8,51]	0,000
> 36	462	345	74,7	3,84	[2,49 a 5,92]	0,000
Províncias						
Gaza	450	291	64,7	1		
Inhambane	184	142	77,2	2,48	[1,62 a 3,79]	0,000
Maputo	175	148	84,6	5,59	[3,36 a 9,30]	0,000

N = Número total de amostragem fator; n = número de amostras positivas; OR = Odds Ratio ou chance de ocorrer; IC = intervalo de confiança.

Tabela 11. Análises da regressão logística das variáveis independentes em relação ao teste de ensaio de imunoadsorção enzimático indireto, para a *Babesia bovis* em bovinos nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, 2010.

Variáveis independentes	N	<i>Babesia bovis</i>				
		n	%	OR	IC a 95%	p-valor
Idade (meses)						
< 12	114	58	50.9	1		
> 12 a ≤ 24	115	96	83.5	0.22	[0.12 a 0.84]	0.000
> 24 a ≤ 36	118	97	82.2	0.27	[0.15 a 0.48]	0.000
> 36	462	369	79.9	0.26	[0.17 a 0.41]	0.000
Províncias						
Gaza	450	335	74.4	1		
Inhambane	184	138	75.0	1.00	[0.67 a 1.48]	0.99
Maputo	175	147	84.0	0.37	[0.23 a 0.60]	0.000

N = Número total de amostragem fator; n = número de amostras positivas; OR = Odds Ratio ou chance de ocorrer; IC = intervalo de confiança.

As amostras positivas apresentaram, após a reação de amplificação e leitura em gel de agarose de 1%, bandas visíveis na altura de 541 pares de base, concordando com o controle positivo para o agente em análise como indicado na (Figura 8).

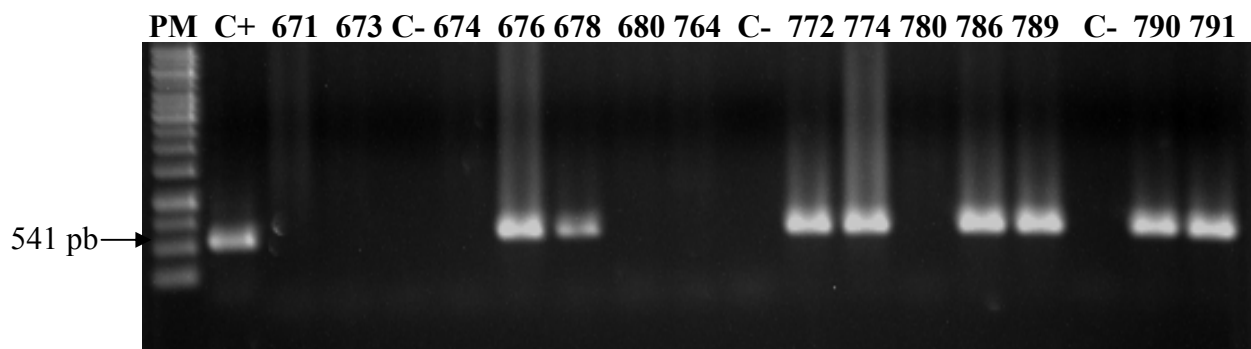


Figura 8. Eletroforese de gel em agarose 1%, dos produtos amplificados de DNA de *Babesia bovis* pela técnica de PCR, em sangue de animais naturalmente infectados. PM: Peso Molecular, C+: controle positivo, C-: controle negativo, de 671 a 791 são amostras testes. A banda de 541 pb corresponde ao produto de amplificação da sequência de *B. bovis*.

Das 240 amostras analisadas pelo teste da PCR para detecção de *B. bigemina* e *B. bovis* observou-se que 10,0% (n = 24) e 37,1% (n = 89) foram positivos, respectivamente. A infecção mista foi detectada em 7,5% (n = 18) das amostras analisadas (Tabela 12).

Tabela 12. Frequência de detecção de DNA de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* pela PCR em amostras de sangue de bovinos segundo os fatores associados nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique e, 2010.

Variáveis	N	<i>Babesia bigemina</i>		<i>Babesia bovis</i>		<i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i>	
		n	%	n	%	n	%
Prevalência	240	24	10,0	89	37,1	18	7,5
Idade (meses)							
< 12	31	2	6,5 ^a	15	48,4 ^a	3	9,7 ^a
> 12 a ≤ 24	48	3	6,3 ^a	20	41,7 ^a	2	4,2 ^a
> 24 a ≤ 36	43	3	7,0 ^a	16	37,2 ^a	3	7,0 ^a
> 36	118	16	13,6 ^a	38	32,2 ^a	10	8,5 ^a
Sexo							
Fêmeas	154	14	9,1 ^a	49	31,8 ^a	11	7,1 ^a
Machos	86	10	11,6 ^a	40	46,5 ^a	7	8,1 ^a
Províncias							
Maputo	80	4	5,0 ^A	35	43,8 ^A	3	3,8 ^A
Inhambane	80	12	15,0 ^A	26	32,5 ^A	9	11,3 ^A
Gaza	80	8	10,0 ^A	28	35,0 ^A	6	7,5 ^A

N = número de amostras coletados por fator, n = número de amostras positivas para *Babesia bigemina* e *B. bovis*. Valores da mesma coluna seguidos da mesma letra de legenda não apresenta diferença significativa entre os fatores estudados pelo teste de χ^2 ou Exato de Fisher em nível de 5% de confiança.

Os resultados das frequências da positividade dos animais pela PCR também foram divididas em quatro grupos etários, sexo e origem geográfica (Tabela 12). Não foi observada diferença significativa nos fatores estudados no teste χ^2 ou exato de Fisher a 5% de significância.

A análise comparativa dos resultados obtidos pelo teste de ELISA-i e PCR demonstrou uma concordância em 6,7% (n = 16) para *B. bigemina* conforme a (Tabela 13). Já para *B. bovis* a concordância foi de 21,1% (n = 65) das amostras analisadas pelo teste ELISA-i e PCR, (Tabela 13).

Tabela 13. Detecção sorológica e molecular de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* pelo teste de ELISA-i e PCR, em bovinos da Região Sul de Moçambique, 2010.

PCR	ELISA-i		Total	
	+	-		
<i>B. bigemina</i>	+	16	11	27
	-	164	49	213
Total		180	60	240
Teste de McNemar com χ^2 dos pares discordantes igual a 49,6124 e p<0,0001				

PCR	ELISA-i		Total	
	+	-		
<i>B. bovis</i>	+	65	24	89
	-	105	46	151
Total		170	70	240
Teste de McNemar com χ^2 dos pares discordantes igual a 132,0229 e p<0,0001				

PCR	ELISA-i		Total	
	+	-		
<i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i>	+	4	8	12
	-	213	15	228
Total		217	23	240
Teste de McNemar com χ^2 dos pares discordantes igual a 188,3077 e p<0,0001				

4 DISCUSSÃO

Babesia bigemina

A babesiose bovina é causada por protozoários do gênero *Babesia* spp. transmitida por carrapatos da família Ixodidae e constitui uma doença de importância econômica na produção pecuária nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (NORVAL et al., 1983). Os resultados das análises sorológicas das 809 amostras de bovinos da Região Sul de Moçambique foram agrupados em quatro faixas etárias (< 12; >12 a ≤ 24; > 24 a ≤ 36 e > 36 meses), sexo (macho e fêmea) e origem geográfica (Maputo, Gaza e Inhambane), para possibilitar uma melhor interpretação dos mesmos na região estudada, (Tabela 9).

Nas províncias de Maputo e Inhambane não foi observada diferença significativa na prevalência de anticorpos contra *B. bigemina*, as duas províncias apresentaram diferença significativa com relação à província de Gaza. Estes resultados classificam a Região Sul de Moçambique como sendo de estabilidade e instabilidade enzoótica para *B. bigemina* conforme metodologia proposta por Mahoney e Hoss (1972).

A existência de áreas de instabilidade enzoótica para *B. bigemina* no presente estudo mostra que a taxa de transmissão deste hemoparasito para animais adultos pelos carrapatos vetores do gênero *Rhipicephalus* não é homogênea na região (MAHONEY, 1975).

Com relação às faixas etárias maiores de 12 meses não foram observadas diferenças significativas nas prevalências para *B. bigemina*, (Tabela 9). Os resultados do presente estudo

corroboram com outros estudos realizados em países das regiões tropicais e subtropicais (JONSSON et al., 2008).

Nas regiões da África Austral e Oriental, os estudos indicam a soroprevalência da babesiose bovina variando de 19,5 a 94,0% em bovinos (MBATI et al., 2002, MTSHALI et al., 2004, TEMBUE et al., 2011a).

Na África do Sul, estudos demonstraram que a prevalência de anticorpos anti-*B. bigemina* variou de 62,4 a 94,0% (DREYER et al., 1998). No Quênia a prevalência de bovinos com *Babesia* spp. foi de 37,1%, de acordo com estudos realizados por Okuthe e Buyu (2006).

Em Moçambique há poucas informações sobre a prevalência de *B. bigemina*. No entanto, as informações sobre a distribuição da babesiose bovina são essenciais para a elaboração de programas de controle estratégico adequado (ALFREDO et al., 2005; MARTINS et al., 2008; TEMBUE et al., 2011a).

Num estudo recente foi observada uma soroprevalência de 71,8% para *B. bigemina* na Região Sul de Moçambique (TEMBUE et al., 2011a). Na mesma região o estudo reportou uma soropositividade de 84,6%, 77,2% e 64,7% para *B. bigemina* nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, respectivamente, (Tabela 9), Tembue et al. (2011a).

As prevalências observadas na presente pesquisa nos diferentes fatores de risco estudados para *B. bigemina* sugerem o grande potencial de transmissão dos carrapatos transmissores na área estudada.

De acordo com Mahoney e Ross (1972), prevalências iguais ou superiores a 75,0% de soropositividade caracterizam uma determinada área como de estabilidade enzoótica. Além disso, indica que os animais se infectam antes de completar o primeiro ano de vida e são constantemente re-infectados, deste modo, mantêm o seu sistema imune sempre ativo contra o agente em análise. No presente estudo, a soroprevalência detectada na Região Sul de Moçambique, foi inferior a 71,8%, para *B. bigemina*, caracterizando a região como uma área de instabilidade enzoótica para a babesiose bovina.

Um resultado epidemiologicamente importante foi observar que a partir da faixa etária maior de 12 meses a soroprevalência para *B. bigemina* não apresenta diferença significativa nas faixas etárias dos animais mais velhos ($p > 0,05$). Com relação aos bezerros, foi observado que 44,7% ($n = 51$) foram reagentes para *B. bigemina*, porcentagem este percentual apresentou uma associação significativa em relação aos resultados das faixas etária maiores de 12 meses.

De uma maneira geral, os resultados sugerem uma elevada taxa de transmissão do agente nesta faixa etária, visto o elevado número de bezerros imunizados naturalmente.

Os resultados demonstraram que as prevalências de animais soropositivos para *B. bigemina* em toda região estudada foram sempre crescentes em relação à categoria menor de 12 meses e que a partir de faixa etária maior de 24 meses observa-se uma tendência de estabilização do crescimento da porcentagem da soropositividade Tembue et al. (2011a).

No presente estudo, foi observado durante as coletas que o manejo dos bezerros varia de criador para criador, tendo sido observado que existem criações que mantêm o confinamento dos bezerros por muito tempo entre 90 a 120 dias sem acompanhar os animais adultos a pastagem, enquanto outros deixam os bezerros irem ao pasto já nos primeiros 60 dias de idade.

Em regiões que apresentam uma situação de estabilidade enzoótica, os animais em crescimento na faixa etária menor de 12 meses são infectados durante os primeiros meses de vida, enquanto ainda estão protegidos por anticorpos colostrais (imunidade passiva), permitindo assim o desenvolvimento da imunidade ativa sem manifestar sinais clínicos da doença.

No entanto, num estudo realizado examinando bezerros com idade inferior a seis meses (JONSSON et al., 2008), concluíram que sob condições de alta infestação de carrapatos pode ocorrer altas taxas de morbidade e mortalidade mesmo durante o período em que a proteção seja conferido pelos anticorpos maternos.

Quando os resultados foram avaliados em função do sexo, os soros de 495 fêmeas e 314 machos foram observados que a soropositividade não apresentou diferença significativa no teste χ^2 na região estudada.

Os resultados sorológicos que apresentaram significância no teste qui-quadrado foram analisados na regressão logística multivariada de forma categorizada (negativa = 0 e positiva =1). Neste modelo foram incluídas todas as faixas etárias e a origem geográfica das amostras.

Quando as variáveis independentes foram submetidas á análise multivariada, todas apresentaram uma associação significativa $p = 0.000$, para *B. bigemina*. Foi observada uma forte associação significativa entre as faixas etárias assim como a origem geográfica dos animais para *B. bigemina*. O fator de risco de infecção por agentes transmitidos por carrapatos em bovinos se mostra presente em relação à faixa etária e a origem geográfica dos animais. Foi observado que chance de ocorrer infecção Odds Ratio (OR) foi fortemente afetado pela idade e a origem dos animais.

Os animais da faixa etária maior de 12 meses e menor ou igual a 24 meses apresentaram 4.98 vezes mais chances de esta infectar com relação aos demais grupos etários. A mesma tendência foi observada com relação à origem dos animais, a província de Maputo foi aquela que apresentou maior chance de infecção, em torno de 5.59 vezes mais chances de se infectarem contra 2.48 vezes observadas na província de Inhambane, (Tabela 10).

Das 240 amostras analisadas pelo teste da PCR para detecção de fragmentos de DNA *B. bigemina* foi observado que 10,0% ($n = 24$) apresentaram resultado positivo. Não foi observada diferença significativa entre os fatores de risco estudados $p > 0,05$. Este resultado comprova a infecção de bovinos por este protozoário na Região Sul de Moçambique, tendo apresentado frequência de positividade baixa.

No entanto, casos clínicos sugestivos de babesiose foram comumente relatados em bovinos pelos criadores durante as coletas. A ausência de sinais clínicos de babesiose pode sugerir que a endemicidade de tais infecções nas áreas estudadas e a frequência de animais assintomáticos e portadores de infecções crônicas. Este grupo de animais podem servir também como reservatórios e fonte de infecções aos carrapatos vetores (HOMER et al., 2000; BOCK et al., 2004).

Na província de Maputo, Região Sul de Moçambique, outros estudos usando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) reportaram em propriedade leiteira, 90,0% de infecção para *B. bigemina*, Martins et al. (2008).

Estes mesmos autores na província de Maputo observaram que a infecção variou entre 29,9 a 72,0% em criações de bovinos, para o mesmo agente etiológico (MARTINS et al., 2010).

Os resultados dos testes sorológicos e moleculares foram discordantes na detecção de infecção por *B. bigemina*. No teste sorológico foi observado que 75% ($n = 180$) das 240 amostras avaliadas foram positivas, mas as mesmas amostras quando avaliadas pela PCR, foi observado que 68,3% ($n = 164$) foram negativas, por outro lado, das 60 amostras consideradas negativas pelo teste de ELISA-i, 4,6% ($n = 11$) foi positiva na PCR. Esta discordância pode indicar duas situações:

A) Os animais conseguiram controlar o parasita e este não está mais circulando no organismo ou B) os animais foram submetidos a um tratamento com dipropionato de imidocarb, uma vez que esta droga limpa os parasitos por completo na corrente sanguínea (KUTTLER, 1975). C) Os animais durante a primo-infecção não apresentam IgG suficiente para a detecção no teste de ELISA-i.

Estes resultados indicam uma discordância substancial entre o teste de ELISA-i e o molecular. Estas discordâncias são normais de acontecer, pois nas infecções crônicas, os anticorpos permanecem circulantes na corrente sanguínea do animal por um longo período, mesmo após o tratamento e recuperação do animal infectado e são esses anticorpos circulantes que são detectadas durante os exames sorológicos, enquanto na PCR a técnica detecta o DNA do parasita circulante no momento da coleta das amostras.

Babesia bovis

Nas províncias foi observada prevalências de 84%, 75% e 74,4% para Maputo, Gaza e Inhambane, respectivamente. Estas porcentagens de animais com anticorpos contra *B. bovis*, não revelou diferença significativa entre Gaza e Inhambane, mas estas duas províncias diferiram significativamente da província de Maputo. Com estes resultados pode se classificar as províncias de Maputo e Inhambane como tendo a estabilidade enzoótica, enquanto, a província de Gaza como sendo aquela que apresenta instabilidade enzoótica para *B. bovis* conforme a classificação de Mahoney; Hoss (1972).

Entre as províncias, a diferença observada na província de Maputo com relação às províncias de Gaza e Inhambane podem ser devido ao sistema de manejo sanitário ou mesmo da introdução recente de animais de áreas livres de carrapatos para áreas endêmicas o que pode ter influenciado nos resultados.

A caracterização desta região como de estabilidade enzoótica para *B. bovis* era um resultado esperado, pois na maioria das áreas da Região Sul de Moçambique abunda espécies de carrapatos, vetores biológicos de *B. bovis*, como *Rhipicephalus microplus*, *R. evertsi evertsi*, *R. sanguineus*, *R. simus* e *Hyalomma marginatum rufipes*, amplamente distribuídos (GRAY; DE VOS, 1981; DE MATOS, 2008).

Com base nos resultados obtidos, é possível inferir que o risco de ocorrência de surtos em animais adultos na região estudada é mínimo, exceto, quando houver introdução de animais provenientes de áreas livres ou de instabilidade enzoótica. Uma condição considerada importante em estudos sorológicos é a idade dos animais, pois se não for considerada em estudos soroepidemiológicos pode mascarar os resultados e induzir a uma interpretação errônea do verdadeiro *status* imunológico do rebanho bovino de uma determinada região (TEMBUE et al., 2011a).

Assim, no presente estudo, os resultados dos bovinos jovens com menor de 12 meses foram incluídos nas análises sorológicas e moleculares. Estes resultados estão de acordo com a janela imunológica entre a imunidade passiva e o desenvolvimento da imunidade adquirida pelos animais jovens, descrita para *Babesia* spp. em animais com idade até 120 dias de vida (DE VOS, 1979).

De Vos e Jorgensen (1992) também verificaram a queda da imunidade colostrar contra *B. bovis* a partir do primeiro mês de vida e nível mínimo observado no quinto mês de vida dos bezerros. Estes autores também verificaram que alguns bezerros demonstraram aumento nos níveis de anticorpos séricos, atribuída a infecção natural, considerada importante para manutenção da imunidade.

No presente estudo, foi observada uma baixa prevalência de bezerros soropositivos para *B. bovis* em 50,9% (n = 58) de um total de 114 bezerros com idades entre zero a 11 meses na região estudada, (Tabela 9). Esta situação sugere que, a partir desta idade se encontra situação de estabilidade enzoótica para este agente infeccioso, pois os animais já adquiriram imunidade ativa e que após a primo-infecção, os animais permanecem sorologicamente positivos para *B. bovis* por vários anos de vida (WRIGHT et al., 1990).

A importância da idade em animais jovens também foi evidenciada em rebanho com aptidão para carne por Alfredo et al. (2005) na província de Tete, centro de Moçambique.

Estudos indicam que a região centro Moçambique é considerada instável para *B. bovis*, foi observado 39,1% de animais soropositivos, reportado por Alfredo et al. (2005). Esta percentagem é muito inferior para atingir 75%, mínimo para uma região ser considerada de estabilidade enzoótica (MAHONEY; ROSS, 1972). Relataram também prevalência crescente até os 24 meses de idade. Entre os animais com idade superior a 24 meses os mesmos autores relataram que a percentagem da soropositividade variou entre 9 a 70,0% para *B. bovis*, nos diferentes locais estudados e consideraram que o controle excessivo de carrapatos em animais adultos é o determinante da ocorrência de criações com instabilidade enzoótica para este hemoparasito.

Nos locais de estabilidade enzoótica, presume-se que os carrapatos vetores encontrem condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento durante a maior parte do tempo durante o ano todo, o que possibilita a infecção dos bovinos desde os primeiros dias de vida.

Dentro das diferentes faixas etárias maiores de 12 meses não houve diferença significativa. Na categoria de animais menor de 12 meses foi observada diferença significativa com as demais faixas etárias ($p < 0,05$), (Tabela 9).

Em relação ao sexo, (Tabela 9), não foi observada diferença significativa na prevalência da soropositividade entre animais machos e fêmeas na região estudada ($p > 0,05$).

A falta de homogeneidade da infecção por *B. bovis* tem sido descrita em outras regiões, como na África do Sul o que faz variar o risco da ocorrência de surtos de babesiose grave e até fatal em diferentes locais (DREYER et al., 1998; MBATI et al., 2002). A distribuição de *Babesia* spp., parasita de bovinos, está associada à presença de carrapatos e a prevalência é elevada nas províncias da Região Sul do país, (Tabela 9) (DE MATOS, 2008; TEMBUE et al., 2011a).

Estudos indicam que casos isolados de surtos de babesiose por *Babesia* spp. geralmente estão relacionados a aumentos sazonais da população de carrapatos, falhas em seu controle ou à introdução de animais susceptíveis oriundos de áreas livres de carrapatos, independentemente, da raça bovina envolvida (MARTINS et al., 2008). A diferença significativa observada entre os animais jovens, quando comparada aos animais adultos pode estar relacionada com a baixa taxa de inoculação de *B. bovis* pelos carrapatos vetores (MAHONEY; MIRRE, 1971).

Os resultados sorológicos que apresentaram significância no teste qui-quadrado foram analisados na regressão logística multivariada de forma categorizada (negativa = 0 e positiva = 1). Neste modelo foram incluídas todas as faixas etárias e a origem geográfica das amostras.

Quando as variáveis independentes foram submetidas análise multivariada, todas apresentaram uma associação significativa para *B. bovis* (Tabela 11). Foi observada uma forte associação significativa entre as faixas etárias, assim como a origem geográfica para a *B. bovis*. O fator de risco de infecção por agentes transmitidos por carrapatos em bovinos estavam presentes em relação à faixa etária e a origem geográfica dos animais, foi observado um Odds Ratio (OR) muito baixo que pode ser considerado fator de proteção.

Os animais da faixa etária maior de 24 meses e menor ou igual a 36 meses apresentaram 0.27 vezes mais chances de se infectarem com relação aos demais grupos etários. Com relação à origem dos animais, a província de Maputo apresentou 0.37 vezes mais chance de infecção quando comparada com relação às outras províncias, (Tabela 11).

Das 240 amostras analisadas pelo teste da PCR para detecção de fragmentos de DNA para *B. bovis* foi observado que 37,1% ($n = 89$) apresentaram resultado positivo (Tabela 12). Não foi observada diferença significativa entre os fatores de risco estudados em nível de significância de 5% no teste χ^2 ou exato de Fisher. Este resultado comprova a infecção de bovinos por este protozoário nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de

Moçambique, tendo apresentado frequência de positividade baixa, mas superior a positividade observada para *B. bigemina*.

No entanto, casos clínicos sugestivos de babesiose foram comumente sendo relatados em bovinos pelos pequenos criadores durante as coletas. A ausência de sinais clínicos de babesiose pode sugerir a endemicidade de tais infecções nas áreas estudadas e a frequência de animais assintomáticos portadores crônicos. Este grupo de animais podem servir como reservatórios e fonte de infecções aos carrapatos vetores (HOMER et al., 2000; BOCK et al., 2004).

Na província de Maputo, Região Sul de Moçambique, Martins et al. (2008), através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) reportaram em criações leiteiras 82,0% de infecção para *B. bovis*. Estes autores observaram também na província de Maputo em criações de bovinos que a infecção para *B. bovis* variou entre 27,3 a 68,4% (MARTINS et al., 2010).

Os resultados dos testes sorológicos e moleculares foram discordantes na detecção de infecção por *B. bovis* (Tabela 13). O teste sorológico revelou que 70,8% (n = 170) foram positivas e 29,2% (n = 70) negativas das 240 amostras avaliadas, mas as mesmas amostras quando avaliadas pela PCR, foi observado que 10,0% (n = 24) foram positivas na PCR, das 70 amostras consideradas negativas no teste de ELISA-i, e 43,8% (n = 105) consideradas positivas pelo teste de ELISA-i foram negativas na PCR. Esta discordância pode significar duas situações:

A) Os animais conseguiram controlar o parasita e este não está mais circulando no organismo, B) ou os animais foram submetidos a um tratamento com dipropionato de imidocarb, uma vez que esta droga limpa os parasitos por completo na corrente sanguínea (KUTTLER, 1975; McHARDY et al., 1974). C) Os animais durante a primo-infecção não apresentam IgG suficiente para a detecção no teste de ELISA-i.

Estes resultados indicam uma discordância substancial entre o teste de ELISA-i e o teste molecular. Estas discordâncias são normais de acontecer, pois nas infecções crônicas, os anticorpos permanecem circulantes na corrente sanguínea do animal por um longo período, mesmo após o tratamento e recuperação do estado de saúde do animal infectado e são estes anticorpos circulantes que são detectados durante os exames sorológicos, enquanto, na PCR a técnica detecta o DNA do parasita circulante no momento da coleta da amostra.

A análise comparativa dos resultados obtidos pelo teste de ELISA-i e PCR demonstrou uma concordância de 6,7% (n = 16) para *B. bigemina*, conforme demonstrado na (Tabela 13). Já para *B. bovis* 27,1% (n = 65) das amostras foram positivas pelo ELISA-i e PCR (Tabela 13).

De acordo com os resultados da presente pesquisa tornou-se evidente que mais pesquisas se fazem necessárias para o monitoramento do agente etiológico e verificação da dinâmica de transmissão do parasito nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, na Região Sul de Moçambique.

O conhecimento das informações com relação aos níveis de anticorpos contra *B. bigemina* e *B. bovis* e circulação destes agentes em bovinos nas áreas estudadas irá disponibilizar informações que provavelmente poderão ser úteis para os gestores da pecuária nacional e compreensão do perfil imunológico dos rebanhos e contribuir no planejamento de futuras intervenções em programas sanitários de prevenção e controle estratégico de carrapatos. Nestas circunstâncias, mais estudos são necessários e justificados, a fim de monitorar os rebanhos com o objetivo de identificar os fatores de riscos para os rebanhos da Região Sul de Moçambique.

5 CONCLUSÃO

Bovinos de diferentes faixas etárias, diferentes origens geográficas e de ambos os sexos foram positivos para *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* ao ensaio de imunoadsorção enzimática indireto e a reação em cadeia de polimerase, apresentando resultados que indicam a instabilidade e estabilidade enzoótica para *B. bigemina* e *B. bovis* respectivamente na região estudada.

CAPÍTULO III

PREVALÊNCIA SOROLÓGICA E DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Anaplasma marginale* E FATORES ASSOCIADOS EM BOVINOS NA REGIÃO NO SUL DE MOÇAMBIQUE

RESUMO

A anaplasmoze bovina é uma doença infecciosa transmitida de forma biológica por carrapatos vetores e mecanicamente por artrópodes hematófagos e fômites. É causada por *Anaplasma marginale*, caracteriza-se por apresentar altas taxas de morbidade e mortalidade em países situados em regiões tropicais, subtropicais e temperados. A doença está disseminada na Região Sul de Moçambique, onde a maioria dos rebanhos é composta de bovinos com aptidão para carne. O presente estudo teve como objetivo investigar a prevalência sorológica e a frequência molecular de *A. marginale* em bovinos das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique. Para tal, 809 amostras de soro e 240 amostras de DNA total de bovinos foram obtidos e testados por teste de ensaio imunoabsorção enzimático indireto (ELISA-i) e pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), respectivamente. O teste do qui-quadrado (χ^2) a nível de significância de 5% foi utilizado para avaliar a associação entre as prevalências e as variáveis sexo, idade e origem geográfica dos animais. A positividade geral foi de 76,5% (n = 619) e 79,2% (n = 190) no teste ELISA-i e PCR, respectivamente. Uma associação significativa ($p < 0,05$) foi observada com relação a faixa etária e a origem geográfica dos animais, respectivamente. Com relação ao sexo não houve associação significativa. Estes resultados indicam que a Região Sul de Moçambique, apresenta uma estabilidade enzoótica para *A. marginale*. Assim, o monitoramento dos animais se faz necessário para o acompanhamento do status sanitário e epidemiológico nos rebanhos bovinos da região estudada.

Palavras-chaves. Anaplasmoze, Epidemiology, ELISA-i, PCR, Moçambique

ABSTRACT

Bovine anaplasmosis is an infectious disease transmitted biologically by ticks vectors and mechanically by arthropod vectors and fomites. It is caused by *Anaplasma marginale*, is characterized by presenting high rates of morbidity and mortality in tropical, subtropical and temperate region. The disease is widespread in southern Mozambique, where most cattle herds are composed of suitability of meat. This study aimed to investigate the serological prevalence and molecular frequency of *A. marginale* in beef cattle in the provinces of Maputo, Gaza and Inhambane, southern Mozambique. To this, 809 and 240 samples of bovine serum and DNA were obtained and tested by an enzyme-linked immunosorbent assay test (i-ELISA) and polymerase chain reaction (PCR), respectively. The chi-square (χ^2) test at significance level of 5% was used to evaluate the association between prevalence and gender, age and geographical origin of animals. The positivity rate was 76.5% (n = 619) and 79.2% (n = 190) in i-ELISA and PCR, respectively. Significant association ($p < 0.05$) was observed with respect to age and geographic origin of animals respectively. Sex there was no significant association. These results indicate that the southern region of Mozambique has an enzootic stability for *A. marginale*. Thus, monitoring of animals is necessary to monitor the sanitary and epidemiological status to prevent disease outbreaks

Key words: Bovine anaplasmosis, epidemiology, i-ELISA, PCR, Mozambique

1 INTRODUÇÃO

A produção pecuária nacional tem crescido significativamente desde meado da década de 90 em Moçambique, como resultado da aprovação e implementação do programa de repovoamento pecuário com recurso a importação de animais dos países vizinhos. No entanto, este aumento na produção de bovinos não foi acompanhado pela melhoria das condições higiênico-sanitárias em várias criações, o que proporcionou a proliferação e disseminação de doenças transmitidas por carrapatos dentre as quais destacam-se a anaplasmoze, babesiose, ehrlichiose e theileriose. Estas doenças constituem um fator limitante na eficiência produtiva e reprodutiva dos animais, além de causar altas taxas de morbidade e mortalidade (MARTINS et al., 2008).

Anaplasmoze bovina, causada por *Anaplasma marginale*, é uma doença infecciosa, não contagiosa. Esta ocorre em regiões tropicais, subtropicais e temperadas em todo o mundo (ALFREDO et al, 2005; JONSSON et al., 2008; TEMBUE et al., 2011b).

A dinâmica da infecção por *A. marginale*, depende de vários fatores, incluindo a capacidade de transmissão vetorial, a susceptibilidade dos bovinos que podem variar entre raças, idade, condição fisiológica e o sistema imunológico do hospedeiro vertebrado (SCOLES et al., 2005). Além disso, as condições agro-ecológicas de cada região geográfica também desempenham um papel importante (BOCK et al, 1997, JONSSON et al., 2008).

Dissemina-se através de picadas de carrapatos dos gêneros *Rhipicephalus* spp., *Hyalomma* spp. e *Dermacentor* spp.. Outras formas de transmissão não biológica incluem meios mecânicos, por artrópodes hematófagos, tais como *Tabanus*, *Stomoxys* e mosquitos, além de fômites (RECEVE; SWIFT, 1977; SCOLES et al., 2005) e transmissão congênita (POTGIETER et al., 1987) e fômites contaminados, como agulhas, aplicadores de brincos, alicates de descorna e equipamentos de castração. A transmissão transplacentária de *A. marginale* pode contribuir para a epidemiologia da anaplasmoze bovina em algumas regiões.

A. marginale provoca uma destruição maciça das hemácias em seus hospedeiros vertebrados, promovida por células do sistema mononuclear fagocitário em órgãos como o baço e fígado (MAHONEY, 1975).

Assim, as infecções causadas por *A. marginale* em bovinos é caracterizada por febre, anemia, icterícia e em muitos casos, a morte pode ocorrer.

O diagnóstico da anaplasmoze bovina pode ser feito pela demonstração de *A. marginale* em esfregaços de sangue de animais clinicamente infectados durante a fase aguda da doença, mas não é confiável para detecção da infecção em animais assintomáticos. Nesses casos, a infecção geralmente é diagnosticada através de métodos indiretos é muito importante porque pode demonstrar a possibilidade da ocorrência ou não de surtos.

Os métodos indiretos, que detectam anticorpos contra antígenos de superfície da *A. marginale*, são ferramentas essenciais para avaliar a prevalência e o estado imunológico dos animais, bem como disponibilizar as informações importantes que podem ser usadas para controlar os principais vetores biológicos responsáveis pela transmissão da enfermidade (MAHONEY, 1975; POTGIETER, 1979).

Os testes sorológicos mais comumente utilizados incluem o teste de aglutinação rápida em cartão, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio de imunoabsorção enzimática indireto (ELISA-i). O teste ELISA-i tem sido reportado como o ensaio que apresenta maior sensibilidade e especificidade, além de sua leitura ser automatizada eliminando deste modo a subjetividade humana (KNOWLES et al., 1996; GITAU et al., 1997; MADRUGA et al., 2001).

O presente estudo teve como objetivo investigar a prevalência de anticorpos da classe IgG contra *A. marginale* pelo teste ELISA-i e a frequência da infecção por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em amostras de soros e sangue de bovinos, de diferentes

faixas etárias e de ambos os sexos provenientes das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ensaio de imunoadsorção enzimática indireto (ELISA-i)

O teste de ELISA-i para *A. marginale* foi realizado segundo protocolo descrito por Madruga et al. (2000), com algumas modificações pontuais.

No teste foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 orifícios (Costar 3590, Corning[®], NY, USA). As cavidades das microplacas de fundo plano foram sensibilizadas com adição de 100µL de antígeno bruto solúvel de *A. marginale*, diluído em sua concentração ótima de reatividade de 5µg/mL. Os antígenos foram diluídos em tampão salino fosfatado Tween 20, 0,1% pH 7,2 (PBST 0,1%), dispostos nas placas no volume de 100µL/poço, com posterior incubação “overnight” a 4°C.

O bloqueio das placas foi realizado adicionando 100µL/poço de leite desnatado místico a 5% diluído em PBST 0,1%. Em seguida as placas foram incubadas por uma hora em estufa a 37°C, findo este tempo foram realizadas cinco lavagens com PBST 20. Soros controles negativos, positivos e os soros testes foram diluídos na concentração de 1:800 em PBST 0,1% e adicionados 100µL/poço em duplicatas nas placas, incubadas por 1 hora a 37°C. Após este tempo foram novamente lavadas como descrito anteriormente. Depois adicionado 100µL/poço do conjugado anti-IgG bovina ligado a peroxidase (Sigma Chemical[®]) na diluição de 1:5.000 em PBST 0,1% e incubados durante 30 minutos a 37°C. Em seguida foram feitas as lavagens das placas como anterior.

Após a adição de 50µL/poço do substrato revelador do teste, ortofenil-enodiamina (Fast-OPD; Sigma Chemical[®]) diluído em água destilada, foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e a reação enzimática foi parada pela adição de 100µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2,5N.

As micro-placas foram lidas em espectrofotômetro multicanal para micro-placas de 96 orifícios (Labsystems iEMS Reader MF) sob comprimento de onda de 492 nm.

O ponto de corte foi determinado como sendo duas vezes e meia (2,5) o valor da média da absorbância dos soros controles negativos, onde as leituras acima desse valor foram consideradas positivas.

A atividade da reação imunológica de cada soro foi calculada pela determinação da amostra teste e a proporção de soropositivos (A/P), considerando-se os soros controles positivos e negativos, como referência, utilizando a seguinte equação matemática descrita por Machado et al. (1997).

$$A/P = \frac{\text{média da absorvância da amostra teste} - \text{média da absorbância dos soros controles negativos}}{\text{média da absorbância dos soros controles positivos} - \text{média da absorbância dos soros controles negativos}}$$

2.2 Extração do ácido desoxirribonucléico (DNA) a partir de amostras de sangue total

A extração do DNA foi realizada a partir das amostras com sangue total contendo EDTA, utilizando o protocolo de extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio conforme descrito por Sambrook et al. (1989) com pequenas modificações (anexo A).

A concentração do DNA obtido de cada amostra foi quantificada por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop[®], em seguida o material foi acondicionado em freezer -20°C até a realização dos testes moleculares.

2.3 Obtenção do DNA do controle positivo

O sangue para a obtenção do DNA controle positivo para a *Anaplasma marginale*, foi produzido por inoculação experimental de um bezerro esplenectomizado, no Laboratório de Prozoologia no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte⁶.

2.4 Determinação da sensibilidade analítica das reações em cadeia da polimerase para *Anaplasma marginale*

A sensibilidade analítica da reação para *A. marginale* foi avaliada por meio de diluições seriadas de um DNA positivo de um animal com parasitemia conhecida. Com este objetivo, foi feito o cálculo da parasitemia em lâmina e hematimetria de um animal positivo para o agente (IICA, 1987). Desta forma, foram feitos esfregaços sanguíneos em lâminas com sangue obtido por punção da veia jugular e contagem do número de hemácias em câmara de Neubauer. A lâmina foi levada ao microscópio óptico e três campos foram examinados para fazer uma média do número de hemácias por campo. Posteriormente, foi determinado o percentual de parasitemia por meio da contagem dos parasitos por campo, somando aproximadamente 21.990 hemácias. Considerando o resultado da hematimetria, foi obtida uma estimativa do número de parasitos por microlitro de sangue.

Após obtenção do valor da parasitemia e considerando o volume de sangue utilizado para extração de DNA 200µL, o volume de DNA que foi obtido ao final da extração 100µL e o volume de DNA usado para fazer a reação de sensibilidade da PCR 1µL, foram estimados a capacidade de detecção da técnica por meio de diluições seriadas (1:10) do DNA positivo em água ultrapura DEPC (Treated water pyrogen free, DNase/RNase free, Cat. №75-0024, Lot. № 450263, USA).

2.5 Reação da amplificação para *Anaplasma marginale*

Os pares de oligonucleotídeos utilizados foram desenhados para identificar o gene que codifica a proteína principal de superfície 5 (*msp5*), cepa norte-americana de *A. marginale* Florida.

Foram utilizados como primers os oligonucleotídeos seguintes:

Primers { *msp5* F (5'GCA TAG CCT CCG CGT CTT TC-3')
(produto -458pb) { *msp5* R (5'TCC TCG CCT TGC CCC TCA GA-3')

Os quais codificam para a sequência de DNA da região 16S rRNA número de acesso no GenBank nº M93392 e que flanqueiam um fragmento da espécie específico de 458 pares de bases (TORIONI et al., 1998).

O protocolo de reação de amplificação do fragmento do gene de 458 pares de bases de 16S rRNA para *A. marginale* foi realizado em volume total de 25µL, empregando-se a seguinte mistura: 5,5µL de água ultra pura (DEPC), 12,5µL master mix, 2µL de primers Forward e Reverse e 3µL de cada amostra de DNA teste. O mix da PCR para *A. marginale* foi preparado em fluxo laminar (Trox® Technik), previamente descontaminado com luz ultravioleta por 15 minutos.

No teste da sensibilidade para a PCR de *A. marginale* foi utilizado um master mix universal e a intensidade das bandas apresentaram um decréscimo regressivo conforme ia diminuindo a concentração do DNA positivo mediante as diluições seriadas foi utilizado à concentração de 0,2µM de primers diferente de 0,8µM descrito por Torioni et al. (1998).

⁶ Gentilmente cedido pelo Laboratório de Protozoologia – Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

No concernente ao gradiente de temperatura de anelamento testado, não foi observada diferenças relevantes tendo se decidido pela manutenção da temperatura de 65°C, a mesma que foi utilizada no protocolo original descrito por Torioni et al. (1998).

As amostras foram submetidas a um pré-aquecimento inicial a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos de desnaturação, 65°C por 58 segundos de anelamento, 72°C por 30 segundos de extensão e 72°C por 10 minutos da extensão final. Os ciclos de amplificação foram realizados no Termociclador Mastercycler gradiente, marca Axygen®.

As reações foram realizadas em placas de poliestireno de 96 poços, código 000032, Ref. PCR-96M₂. HS-C, Lot.100101-138, Axygen Scientific Inc. CA-USA.

2.6 Electroforese de DNA em gel de agarose

Após as reações de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, contendo 0,5mg/mL de brometo de etídeo, em tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato, 2mM EDTA pH 8,0).

Um volume de 10µL de cada amostra, acrescido de 2µL de tampão de amostra de azul de bromofenol foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada a 90V durante 60 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados e fotografados em transluminador de luz ultravioleta, acoplado a um analisador de imagens (L PIX TOUCH).

2.7 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados, as amostras dos animais foram agrupadas em diferentes categorias: faixa etária (< 12 meses, > 12 a ≤ 24 meses, > 24 a ≤ 36 meses e > 36 meses), sexo (macho e fêmea) e origem geográfica (Maputo, Gaza e Inhambane), para este agente as análises estatísticas foram feitas também segundo as locais de coleta.

Na primeiramente, foi feita uma triagem da positividade das variáveis independentes pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ou exato de Fisher a nível de significativa de 5%. Todas aquelas variáveis que apresentaram associação significativa foram incluídas numa nova análise de regressão logística para construção um modelo multivariado.

O modelo multivariado de regressão logística foi aplicado para análises dos resultados sorológicos nas variáveis independentes (faixas etárias e origem geográfica das amostras) em função do resultado sorológico. Para este propósito os resultados foram analisados em nível dicotômico qualitativo (negativo = 0 e positivo = 1).

Os riscos relativos ou *Odds Ratio* (OR) foram calculados para as variáveis independentes que apresentaram significância estatístico no teste χ^2 . Também foi utilizado o teste de McNemar para cálculo do χ^2 dos pares discordantes entre o teste de ensaio de imunoabsorção enzimático indireto (ELISA-i) e a reação em cadeia de polimerase (PCR). Todas as análises foram realizadas usando-se o programa estatístico e computacional Rstudio e BioEstat, versão 4.0 (AYRES et al., 2000).

3 RESULTADOS

Das 809 amostras de soros de bovinos avaliadas pelo teste de ELISA-i, 76,5% (n = 619) apresentaram anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale*. A soroprevalência da anaplasose bovina nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique e sua associação com os diversos fatores estudados estão apresentados na (Tabela 14). Associação significativa no teste χ^2 (p<0,05) foi observada no grupo etário menor de 12 meses com relação aos demais grupos etários, demonstrando uma menor exposição ao agente nesta faixa etária. Com relação ao sexo não foi observada associação

significativa entre os sexos no teste χ^2 ($p > 0,05$), demonstrando que a infecção é independente do fator sexo (Tabela 14). Com relação à origem geográfica, diferença significativa no teste χ^2 ou exato de Fisher ($p < 0,05$) foi observada, tendo as províncias apresentado a soropositividade de 89,1% ($n = 156$), 68,4% ($n = 308$) e 84,2 ($n = 155$) para Maputo, Gaza e Inhambane respectivamente (Tabela 14).

A frequência de bovinos sororreagentes para *A. marginale* nas localidades também seguiu o mesmo perfil observado para as províncias. No entanto, a localidade Chicochane no Distrito de Moamba, pertencente à província de Maputo teve a maior frequência de animais soropositivos, com 93,8% ($n = 45$). Por outro lado, a localidade de Macalawane no Distrito Chibuto, pertencente à província de Gaza, teve a menor frequência de bovinos soropositivos com 47,9% ($n = 78$), (Tabela 14).

Tabela 14. Prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em bovinos das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, detectados pelo ensaio imunoadsorção enzimático indireto e fatores associados, 2010.

Variáveis	N	Positividade	
		n	%
Prevalência	809	619	76.5
Idade (meses)			
< 12	114	72	63.2 ^a
> 12 a ≤ 24	115	92	80.0 ^b
> 24 a ≤ 36	118	98	83.1 ^b
> 36	462	357	77.3 ^b
Sexo			
Fêmeas	495	379	76.6 ^a
Machos	314	240	76.4 ^a
Maputo	175	156	89.1 ^A
Chicochane	48	45	93.8 ^a
Chobela	79	70	88.6 ^b
Changalane	48	41	85.4 ^b
Inhambane	184	155	84.2 ^A
Chitsuleta	61	50	82,0 ^b
Nhamasso-Chambule	59	51	86,4 ^b
Chissibuca	64	54	84,4 ^b
Gaza	450	308	68.4 ^B
Mazivila	104	92	88.5 ^b
Macarretane	47	36	76.6 ^b
Pontinha	136	102	75.0 ^b
Macalawane	163	78	47.9 ^c

N = número de amostras por fator, n = número de amostras positivas para *Anaplasma marginale*. Os valores da mesma coluna seguidas de letras diferentes mostram diferença significativa entre os grupos ou fatores (a, b, c, d ou A e B), no teste χ^2 ou exato de Fisher ($p < 0,05$).

No teste de sensibilidade analítica da PCR utilizando sangue controle positivo, o limiar de detecção foi de 0,3% ou $2,19 \times 10^5$, células parasitadas/ μL de sangue (Figura 9).

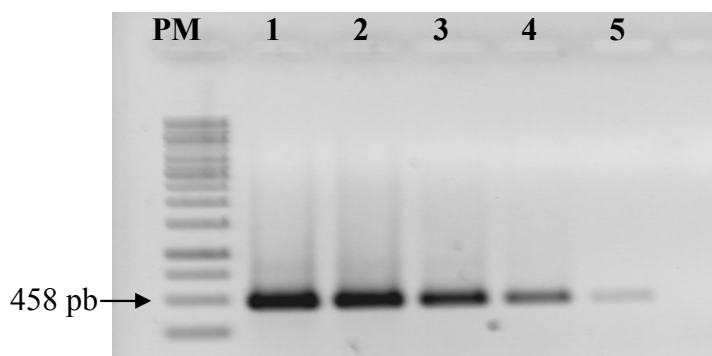


Figura 9. Limite de detecção de DNA de *A. marginale* pela PCR, em amostras de sangue de bovinos experimentalmente infectados, procedentes da Universidade Federal de Minas Gerais. PM– Peso molecular 1kb (Ludwig); Linha 1 - $2,19 \times 10^4$ células parasitadas/uL, Linha 2 - $2,19 \times 10^3$ células parasitadas/uL, Linha 3 - $2,19 \times 10^2$ células parasitadas/uL, Linha 4 - $2,19 \times 10^1$ células parasitadas/uL, Linha 5 - $2,19 \times 10^0$ células parasitadas/uL. A seta indicativa da banda de 458 pb correspondente ao produto de amplificação de *A. marginale*. A análise foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE pH 8,0, contendo brometo de etídeo 0,5mg/mL.

As amostras positivas apresentaram, após a reação de amplificação e leitura em gel de agarose 1%, bandas visíveis em nível de 458 pares de base, concordando com o controle positivo para o agente em análise como indicado na (Figura 10).

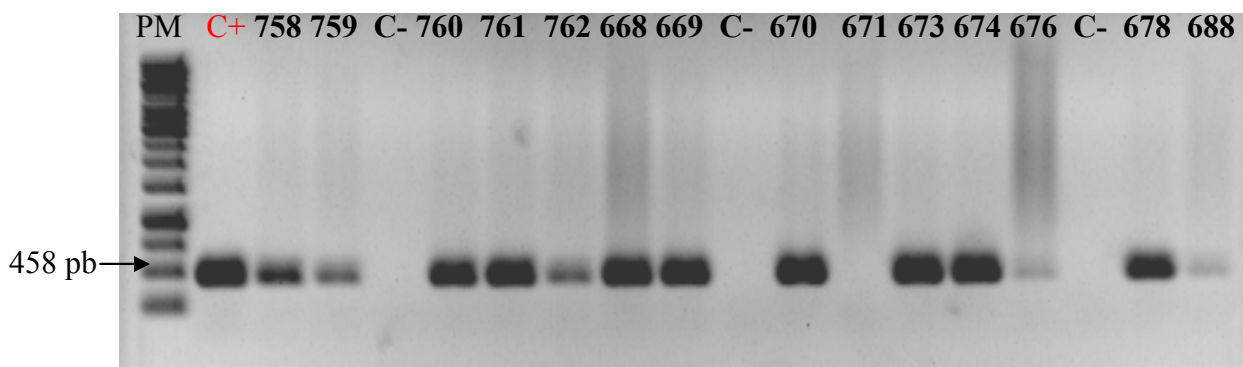


Figura 10. Eletroforese de gel em agarose 1%, dos produtos amplificados de DNA de *A. marginale* pela técnica de PCR, em sangue de animais naturalmente infectados. PM: Peso Molecular, C+: controle positivo, C-: controle negativo, de 758 a 688 são amostras testes. A banda de 458 pb corresponde ao produto de amplificação da sequência de *A. marginale*.

As razões de chances nas variáveis independentes quanto a faixa etária e a origem geográfica dos animais, analisadas no modelo multivariada para *A. marginale* estão expostos na (Tabela 15).

Tabela 15. Análises da regressão logística das variáveis independentes em relação ao teste de ensaio de imunoadsorção enzimático indireto para *Anaplasma marginale* em bovinos segundo local de coleta, na Região Sul de Moçambique, 2010.

Variáveis Independentes	N	Positividade				
		n	%	OR	IC a 95%	p-valor
Idade (meses)						
< 12	114	72	63.2	1		
> 12 a ≤ 24	115	92	80.0	3.46	[1.80 a 6.65]	0.000
> 24 a ≤ 36	118	98	83.1	5.50	[2.78 a 10.86]	0.000
> 36	462	357	77.3	7.03	[4.01 a 12.31]	0.000
Localidades						
Chitsuleta	61	50	82.0	1		
Nhamasso-chambule	59	51	86.4	1.31	[0.55 a 3.14]	0.54
Chissibuca	64	54	84.4	1.27	[0.51 a 3.19]	0.61
Mazivila	104	92	88.5	1.06	[0.48 a 2.35]	0.88
Macalawane	163	78	47.9	0.40	[0.20 a 0.82]	0.05
Pontinha	136	102	75.0	1.15	[0.54 a 2.47]	0.72
Macarretane	47	36	76.6	1.43	[0.55 a 3.74]	0.46
Chobela	79	70	88.6	4.72	[1.76 a 12.65]	0.001
Chicochane	48	45	93.8	9.27	[1.93 a 44.62]	0.001
Changalane	48	41	85.4	5.32	[1.72 a 16.43]	0.001

N = Número de amostras por variável; OR = Odds Ratio ou chance de ocorrer; n = Numero de positivos; IC = Intervalo confiança.

Das 240 amostras analisadas pelo teste da PCR para detecção de *A. marginale*, 79,2% (n = 190) apresentaram resultado positivo (Tabela 16). Este resultado comprova a infecção e a circulação em bovinos desta rickettsia na Região Sul de Moçambique, tendo apresentado alta frequência na positividade e concentração parasitemica detectável pelo teste da PCR.

As frequências da positividade na reação da PCR foram divididas em quatro grupos etários, a saber: <12 meses (n = 30), >12 a ≤ 24 meses (n = 49), > 24 a ≤ 36 meses (n = 42) e > 36 meses (n = 119), onde 86,7% (n = 26), 79,6% (n = 39), 81,0% (n = 34) e 76,5% (n = 91) dos animais foram positivos, respectivamente. Com relação à faixa etária, não foi observada diferença significativa (p>0,05), (Tabela 16).

Tabela 16. Frequência de DNA de *Anaplasma marginale* em bovinos das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, detectados pela reação em cadeia da polimerase e fatores associados, 2010.

Variáveis	N	Positividade	
		n	%
Prevalência	240	190	79,2
Idade (meses)			
< 12	30	26	83,7 ^a
> 12 a ≤ 24	49	39	79,6 ^a
> 24 a ≤ 36	42	34	81,0 ^a
> 36	119	91	76,5 ^a
Sexo			
Fêmeas	154	124	80,5 ^a
Machos	86	66	76,7 ^a
Províncias			
Maputo	80	72	90,0 ^A
Gaza	80	67	83,8 ^A
Inhambane	80	51	63,8 ^B

N = número de amostras coletadas por fator, n = número de amostras positivas para *A. marginale*. Os valores da mesma coluna seguidos da mesma letra, não apresentam diferença significativa entre os fatores estudados no teste χ^2 ou exato de Fisher ($p < 0,05$).

A análise comparativa dos resultados obtidos pelo teste de ELISA-i e PCR, demonstrou haver uma concordância de 60,4% (n = 145) nos resultados para *A. marginale*. Por outro lado, houve discordância em 16,7% (n = 40) e 18,8% (n = 45) das amostras analisadas pelo teste de ELISA-i e PCR, respectivamente, conforme demonstrado na (Tabela 17).

Tabela 17. Detecção sorológica e molecular de anticorpos da classe IgG e DNA para *Anaplasma marginale* por ensaio de imunoadsorção enzimática indireta e reação em cadeia da polimerase, 2010.

PCR	ELISA-i		Total	
	+	-		
<i>Anaplasma marginale</i>	+	145	45	190
	-	40	10	50
Total		185	55	240

Teste de McNemar com χ^2 dos pares discordantes igual a 0,1882 e $p = 0,6644$

4 DISCUSSÃO

A idade é um fator fundamental em qualquer estudo epidemiológico. Estudos soropidemiológicos que não consideram a idade da população pode ter seus resultados mascarados e induzir uma interpretação errônea do verdadeiro *status* imunológico da população de uma determinada região (TEMBUE et al., 2011b).

Desta forma, os resultados observados a partir da análise das amostras de soro dos 809 bovinos da Região Sul de Moçambique foram agrupados em quatro faixas etárias (< 12

meses, > 12 a ≤ 24 meses, > 24 a ≤ 36 meses e > 36 meses), sexo (macho e fêmea) e origem geográfica (Maputo, Gaza e Inhambane).

Os anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale* foram detectados em 76,5% (n = 619) do total das amostras analisadas. Esta prevalência de anticorpos contra *A. marginale* foi considerada alta caracterizando a região estudada como de estabilidade enzoótica para esta riquéttsia (MAHONEY; HOSS, 1972). Com intuito de verificar possíveis diferenças significativas na frequência de anticorpos contra *A. marginale*, os resultados também foram avaliados segundo as províncias tendo apresentado as seguintes porcentagens 89,1% (n = 156), 68,4% (n = 308) e 84,2% (n = 155) para Maputo, Gaza e Inhambane, respectivamente (Tabela 14).

As províncias de Maputo e Inhambane apresentaram estabilidade enzoótica para o agente estudado, enquanto a província de Gaza com um percentual de 68,4% (n = 308), se demonstrou instável para *A. marginale*. Foi observada diferença significativa entre as províncias pelo teste χ^2 (p<0,05).

Os resultados da presente pesquisa foram superiores aos 62,8% relatados por Alfredo et al. (2005), na região Central de Moçambique. Esta diferença pode ser em virtude do sistema de manejo adotado para o controle de carrapatos, que pode estar contribuindo para dificultar a manutenção do ciclo do biológico de carrapatos e/ou ausência de moscas hematófagas como os tabanídeos, *Culex* e *Stomoxys* (SCOLES et al., 2005).

A Região Sul de Moçambique, concentra predominantemente bovinos constituídos principalmente por raças zebuínas e seus mestiços, naturalmente tolerantes ao parasitismo por carrapatos (JONSSON et al., 2008).

Os resultados do presente estudo demonstram o elevado potencial de transmissão e ressaltam a importância da necessidade de medidas de controle (RAJPUT et al., 2006).

Estudos realizados em outros países africanos, nas regiões Austral e Leste de África indicam que a prevalência de *A. marginale* variou de 32,1 a 100,0% (DREYER et al., 1998). Esses resultados demonstram não apenas áreas de estabilidade, mas também situações de instabilidade enzoótica entre países ou regiões, que podem estarem relacionados com as medidas higiênico-sanitárias e as condições edafico-climáticas que permitem ou não a sobrevivência de vetores de *A. marginale* (SCOLES et al., 2005; JONSSON et al., 2008).

Estudos realizados na África do Sul utilizando o ELISA-i como teste de diagnóstico, revelaram taxas de soropositividade para anaplasose bovina variando de 87% a 100% (DREYER et al., 1998; MBATI et al., 2002; MTSHALI et al., 2004; MTSHALI et al., 2007; NDOU et al., 2010).

Na república da Zâmbia, oeste de Moçambique, a prevalência de *A. marginale* foi analisada através do teste de ELISA-i e revelou percentuais de 85,7%, 85,9%, 84,7% e 75,0% em províncias localizadas nas regiões Ocidental, Central, leste e sul naquele país vizinho, respectivamente (JONGEJAN et al., 1988).

Na República Unida da Tanzânia, norte de Moçambique, a prevalência de *A. marginale* foi relatada como variando entre 37,0% e 40,0% em Iringa e Tanga, respectivamente (SWAI et al., 2005). Além disso, na república do Quênia, região da África Oriental foram reportadas soroprevalências muito menor em relação a outras regiões do continente, variando de 32,1% a 36,0% (OKUTHE; BUYU, 2006).

As diferenças na prevalência da anaplasose bovina entre diferentes regiões geográficas de África pode ser explicada pelas diferenças climáticas que podem favorecer ou inviabilizar a sobrevivência dos carrapatos vetores responsáveis pela transmissão de *A. marginale*, ou ainda pelas medidas que cada país ou região adota para o controle de ectoparasitos.

Resultados semelhantes foram observados por Bock et al. (1997) que demonstraram que fatores como raça, idade, condição fisiológica e imunológica podem interferir nas taxas

de soropositividade. É interessante notar que a taxa de inoculação do parasito é dependente dos vetores biológicos (DREYER et al., 1998; MTSALI et al., 2007; NDOU et al., 2010), além da participação de outras fontes de transmissão como mecânica por dípteros hematófagos e por fômites (SCOLE et al., 2005). Esta forma de infecção tem muita importância em países onde se realizam programas de vacinação obrigatória em massa, podendo contribuir para a disseminação do agente etiológico e interferir na condição de estabilidade enzoótica de qualquer área geográfica quando o agente é prevalente.

Com relação à faixa etária foi observada uma menor prevalência de anticorpos contra *A. marginale* nos bezerros na região estudada 63,2% (n = 72), (Tabela 14).

Os resultados sorológicos que apresentaram significância no teste χ^2 ou exato de Fisher foram analisados no modelo de regressão logística multivariada de forma categorizada (negativa = 0 e positiva = 1). Neste modelo foram incluídas todas as faixas etárias e a origem geográfica das amostras e devido à importância que é dada a anaplasmoze bovina, a sua análise com relação à origem das amostras foi feita segundo a localidade de coleta nível província.

Quando as variáveis independentes foram submetidas à análise multivariada, com relação à faixa etária foi observada uma associação significativa em todos os grupos etários (p = 0.000), (Tabela 15). Com relação à localidade foi observada uma forte associação significativa entre as localidades da Chobela, Chicochane e Changalane todas da província de Maputo (p = 0.001), nas outras localidades não foram observadas uma associação significativa (p>0,05).

O fator de risco de infecção por agentes transmitidos por carrapatos em bovinos para *A. marginale* estavam presente em relação à faixa etária. Foi observado um Odds Ratio (OR) que foi fortemente afetado pela idade.

Os animais da faixa etária maior de 36 meses apresentaram 7.03 vezes mais chances de se infectarem com relação aos grupos etário mais inferior. Com relação à origem dos animais, a província de Maputo foi aquela que apresentou maior chance de infecção, em torno de 9.27 vezes mais chances de se infectarem na localidade de Chicochane contra 5.32 vezes observada na localidade da Changalane, (Tabelas 15).

A origem geográfica e a faixa etária constituem fatores de risco para infecção por *A. marginale*, na Região Sul de Moçambique.

A prevalência de anticorpos contra *A. marginale* dos bezerros apresentou diferença significativa (p<0,05) quando comparado aos demais grupos etários. Na categoria de animais com idades superiores a 12 meses não foi observada diferença entre os demais grupos etários, entretanto, na análise multivariada as 4 faixas etárias apresentaram diferença significativa entre eles. Esta situação pode ter ocorrido em função das diversas questões que envolvem a qualidade da imunidade passiva adquirida via colostro, o tempo e a qualidade de desenvolvimento da imunidade adquirida a partir da infecção natural por estimulação ativa do patógeno. Estes resultados demonstram que um grande número de animais não foram primoinfectados, o que pode favorecer a ocorrência da doença aguda no rebanho em animais mais velho da região estudada. Esta situação explica o relato de alguns criadores sobre doença clínica observada em bezerros, quando trocados de pastagem em função do desmame.

Dentro da mesma província os resultados foram analisados entre os diferentes locais de coleta. Foi observada diferença significativa na frequência de animais positivos para *A. marginale* entre as localidades nos Distritos das províncias de Maputo e Gaza no teste χ^2 e exato de Fisher (p<0,05) (Tabela 14). Enquanto na província de Inhambane não houve diferença significativa no teste χ^2 ou exato de Fisher (p>0,05).

A diferente condição imunológica de bezerros em diferentes criações, bem como a dinâmica da infecção entre as categorias de idade de animais estudados podem contribuir na obtenção de informações sobre o *status* imunológico do rebanho.

Em termos gerais, os bezerros com idade inferiores a 12 meses ainda se encontram em fase de transição quanto à imunidade contra *A. marginale*.

A partir da análise da prevalência da soropositividade para *A. marginale* na Região Sul de Moçambique em relação ao sexo (Tabela 14), não foi observada diferença significativa entre machos e fêmeas.

As análises dos resultados da PCR e os fatores associados estão apresentados na (Tabela 16). No presente estudo foi observada frequência da positividade de 79,2% (n = 190) pela PCR e não foi observada diferença significativa no teste qui-quadrado e exato de Fisher entre a origem geográfica das amostras. Com relação à faixa etária e sexo não foi observada diferença significativa, demonstrando que todos os animais independente da idade e sexo tem a mesma chance de ser infectados.

A PCR é uma ferramenta que tem sido amplamente utilizada na investigação do material genético de agentes causadores de doenças em várias áreas de conhecimento (SINGH, 1997; CONRATHS; SCHARES, 2006; MOLAD et al., 2006; GASSER, 2006).

A análise comparativa dos resultados obtidos pelo teste de ELISA-i e PCR demonstrou uma concordância de 60,4% (n = 145) para *A. marginale*, conforme demonstrado na (Tabela 17). Os resultados dos testes sorológicos e moleculares foram discordantes na detecção de infecção por *A. marginale* (Tabela 17). O teste sorológico revelou que das 240 amostras avaliadas 77,1% (n = 185) foram positivas e 22,9% (n = 55) negativas, mas as mesmas amostras quando avaliadas pela PCR, foi observado que 18,8% (n = 45) foram positivas na PCR, das 55 amostras consideradas negativas no teste de ELISA-i, e 16,7% (n = 40) consideradas positivas pelo teste de ELISA-i foram negativas na PCR. Esta discordância pode significar duas situações:

A) os animais conseguiram controlar o parasita e este não está mais circulando no organismo, B) ou os animais foram submetidos ao tratamento com drogas com capacidade de limpar os parasitos por completo na corrente sanguínea (McHARDY et al., 1974; KUTTLER, 1975). C) Os animais durante a primo-infecção não apresentam IgG suficiente para a detecção no teste de ELISA-i.

Os resultados obtidos no presente estudo podem ajudar a explicar e a entender o porquê da anaplasose bovina ser considerada uma enfermidade frequente e uma das principais causas de morbi-mortalidade de bovinos em crescimento no país, mesmo em áreas de estabilidade enzoótica. Nas regiões de estabilidade enzoótica para *A. marginale*, as condições edafico-climáticas favorecem o desenvolvimento do ciclo de carrapatos vetores deste agente infeccioso no país. No caso de *A. marginale* a transmissão também ocorre de forma mecânica por dípteros e iatrogênicos (RECEVES; SWIFT, 1977).

Esta situação se torna evidente em áreas onde se verifica situação de instabilidade enzoótica para os agentes causais da anaplasose bovina. Além disso, deve-se considerar a possibilidade da ocorrência de diferentes práticas de manejo que também podem refletir na frequência de anticorpos contra *A. marginale* no rebanho, visto que no país além de uma variedade de carrapatos vetores existe também abundância de artrópodes hematófagos como os tabanídeos, *Stomoxys* e mosquitos que têm sido incriminados pela elevada prevalência de *A. marginale* no rebanho (SCOLES ET al., 2005).

Em termos práticos, a condição de estabilidade enzoótica na Região Sul de Moçambique, indica um baixo risco da ocorrência de casos clínicos de surtos por anaplasose bovina nos animais adultos, nos quais a doença se apresenta de forma mais grave, com a exceção de animais importados e provenientes de áreas de instabilidade enzoótica.

Em relação aos animais menores de 12 meses, deve ser adotado um manejo sanitário adequado, com exposição precoce e gradual ao agente infeccioso, quando ainda existem anticorpos colostrais protetores, que diminuem o risco da ocorrência da doença aguda e

promovem o desenvolvimento da imunidade ativa. Desta forma, a adoção de outras formas de prevenção, como a quimioprofilaxia podem minimizar o risco dos animais em crescimento de apresentarem a doença clínica quando da primo-infecção e no período de diminuição da imunidade colostrar.

Estes resultados fornecem informações importantes na compreensão do *status* imunológico do efetivo bovino da Região Sul do país, que pode servir de subsídios para os gestores da pecuária nacional, bem como auxiliar no planejamento de futuras intervenções na Sanidade Animal e na educação sanitária dos criadores de bovinos no país. Nestas circunstâncias, mais estudos se fazem necessários e justificados, a fim de monitorar os rebanhos e identificar outros fatores que possam constituir um risco a estabilidade enzoótica da Região Sul de Moçambique.

5 CONCLUSÃO

O agente da anaplasnose bovina está circulando nos bovinos e nestas circunstâncias mais estudos se fazem necessários e justificados a fim de monitorar os rebanhos e identificar outros fatores que possam constituir um risco a estabilidade enzoótica da Região Sul de Moçambique.

CAPÍTULO IV

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR PARA O GÊNERO *Borrelia* EM BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS NA REGIÃO NO SUL DE MOÇAMBIQUE

RESUMO

A Borreliose em bovinos caracteriza-se por apresentar ampla distribuição geográfica, sendo reconhecida na América, Europa, Ásia, África e Oceania. Os agentes etiológicos, espiroquetas do gênero *Borrelia*, são transmitidas por carrapatos a um grande número de mamíferos, aves e o homem. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de anticorpos da classe IgG anti-*Borrelia burgdorferi*, bem como detectar a presença de fragmentos de DNA do agente em bovinos da Região Sul de Moçambique, além de estabelecer os fatores associados (idade, sexo e origem geográfica das amostras). 809 amostras de soros e 480 sangue de bovinos, aparentemente sadios, provenientes das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, foram avaliados pelo teste de imunoadsorção enzimática indireto (ELISA-i) e pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa bactéria foi detectada pela primeira vez em bovinos de áreas rurais nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique através do teste de ELISA-i e da PCR. Das 809 amostras de soros avaliadas pelo teste de ELISA-i, 85,9% (n = 695) foram positivas. E das 480 amostras de DNA avaliados pela PCR, 3,4% (n= 18) foram positivas. Os resultados do presente estudo demonstram que o agente da borreliose bovina circula na região estudada e que os bovinos podem servir como fonte de infecção para carrapatos. Este consitui-se no primeiro relato de *Borrelia* spp. em bovinos em Moçambique. Nestas circunstâncias justifica-se a realização de novos estudos sobre o assunto para a descrição do vetor ou vetores responsáveis pela transmissão, assim como do agente etiológico envolvido e o monitoramento sorológico para identificação dos animais expostos a condição de risco.

Palavras chaves. Borreliose bovina, carrapatos, aborto epizoótico bovino.

ABSTRACT

Borreliosis in bovine is characterized by presenting wide geographical distribution, being recognized in America, Europe, Asia, Africa and Oceania. The etiological agent, spirochetes of the genus *Borrelia* are transmitted by ticks to a large number of mammals, birds and man. The purpose of this study was to evaluate IgG antibodies anti-*Borrelia burgdorferi* and detects DNA fragment of the agent in beef cattle from southern Mozambique, as well as establishes the associated factors (age, sex and geographic origin of samples). In this study, 809 serum samples and blood of beef cattle, apparently healthy, from the provinces of Maputo, Gaza and Inhambane, southern Mozambique were assessed by enzyme-linked immunosorbent (i-ELISA) and by polimerase chain reaction (PCR). This bacterium was first detected in beef cattle from rural areas in the provinces of Maputo, Gaza and Inhambane, southern Mozambique through i-ELISA and PCR from the 809 serum samples tested using i-ELISA, 85.9% (n = 695) were positive, while from the 480 samples of DNA measured by PCR, 3.4% (n = 18) were positive. The results of this study demonstrate that the agent of bovine borreliosis circulates in the region studied and cattle can serve as a source of infection for ticks. This constitutes the first report of *Borrelia* spp. in beef cattle in Mozambique. In this circumstance it is appropriate to carry out new studies on the subject to describe the vector or vectors responsible for transmission as well as the etiological agent for identification and serological monitoring of animals exposed to the risk condition.

Keywords. Borreliosis bovine, ticks, epizootic bovine abortion.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Borrelia* é composto de muitas espécies de bactérias que são patogênicas aos mamíferos incluindo seres humanos. A borreliose em bovinos é uma enfermidade infecciosa determinada por espiroquetas do gênero *Borrelia*, e tem a *Borrelia theileri* como principal agente etiológico.

As hemoparasitoses mais frequentes em bovinos na África Austral são as protozooses: babesiose, anaplasiose, ehrlichiose e theileriose cujos agentes etiológicos são a *Babesia* spp., *Anaplasma marginale*, *Ehrlichia ruminantium* e *Theileira parva*, respectivamente (SIMUUNZA et al., 2011). Todos estes hematozoários têm os carrapatos ixodídeos como vetores biológicos. Uma vez que a única forma natural para a infecção por *Borrelia* é através da picada do vetor infectado, a prevalência deste patógeno em carrapatos representa um importante indicador de risco para os rebanhos bovinos e seres humanos.

Os sinais clínicos da borreliose em outras espécies animais envolvem a síndrome musculoesquelética caracterizado pelo comprometimento das articulações com quadro de artrite progressiva (ROTHWELL et al. 1989, PARKER; WHITE 1992; WELLS et al., 1993). Outro sinal recentemente detectado é a ocorrência de dermatite digital ocasionada por *B. burgdorferi*. Estudos realizados na Europa e na América do Norte incriminam as espiroquetas como sendo as causas de uma dermatite digital com etiologia desconhecida (BLOWEY et al., 1992; BLOWEY et al., 1994, GRUND et al., 1995). O comprometimento neurológico com quadro de meningite tem sido reportado em infecções por *B. burgdorferi*. Anemia progressiva pode se instalar devido à atividade hemolítica da *Borrelia* (SHARMA et al., 2000).

A descrição de espiroquetas no sangue de bovinos foi registrada primeiramente por Sir Arnold Theiler em 1902, na província de Gauteng na República da África do Sul, durante o exame de esfregaços confeccionados a partir de sangue de bovinos que haviam abortado de causas desconhecidas e foi um achado ao acaso durante a pesquisa do agente etiológico de uma enfermidade denominada naquela época do “mal da bile” ou anaplasiose (CALLOW, 1967).

O agente foi descrito originalmente como *Spirochaeta theileri*, e posteriormente renomeado de *Borrelia theileri* Laveran 1903. Esta espécie mais tarde foi reportada em bovinos, ovinos, equinos, cervídeos, ímpala e outros bovinos silvestres (IRVIN et al., 1973; MATTON; MELCKEBEKE, 1990) como causadora de anemia moderada. Porém, quando associada a outros hematozoários, produz uma doença grave (IRVIN et al., 1973; SMITH et al., 1985).

A espiroquetose dos bovinos tem distribuição cosmopolita, ocorrendo em todas as regiões geográficas do mundo onde há ocorrência de carrapatos potenciais transmissores (NEITZ, 1956, CALLOW, 1967, VIVAS et al. 1996).

Os principais vetores são carrapatos do gênero *Rhipicephalus* e as espécies *R. evertsi evertsi* e *R. appendiculatus* (SMITH et al. 1985, QUINN et al., 1994), podendo ser essa *Borrelia* patogênica para o carrapato, como relatado para *Rhipicephalus microplus* (SMITH et al., 1978, VIVAS et al., 1996).

Os estudos soropidemiológicos demonstram que animais sororeagentes em sua maioria, são assintomáticos (BENXIU: COLLINS, 1994).

Estudos realizados no Brasil revelaram uma soropositividade acima de 50% (FONSECA et al., 1996).

O diagnóstico sorológico deve ser interpretado em conjunto com os dados epidemiológicos, sendo os ensaios de imunoadsorção enzimático indireto (ELISA-i) e western blotting os testes mais indicados para o diagnóstico da borreliose (BENXIU; COLLINS, 1994; FONSECA et al., 1996; ISHIKAWA et al., 1997).

A *Borrelia coriaceae*, tem sido incriminada como sendo responsável pelo o aborto enzoótico bovino, enfermidade que acomete bovinos e cervídeos (QUINN et al., 1994; ZINGG; LEFEBVRE, 1994). Durante muitos anos essa doença teve sua etiologia desconhecida, tendo sido relacionada a vírus, a chlamídia e a outras bactérias, até que se observou espiroquetose congênita em bezerras (OSELBOLD et al., 1986) e isolamento de espiroqueta a partir de carrapatos da espécie *Ornithodoros coriaceus* em áreas onde ocorria aborto enzoótico (LANE; MANWEILER, 1988).

Em 1987, caracterizou-se então *B. coriaceae*, definindo seu vetor e enfermidade (JOHNSON et al., 1987). Posteriormente estudos imunológicos e epidemiológicos elucidaram o ciclo biológico (ZINGG; LEFEBVRE, 1994). No carrapato esta *Borrelia* realiza a transmissão transovariana e trans-estadial (LANE; MANWEILER, 1988).

Em bovinos normalmente não ocorra apresentação clínica da doença, além de abortos enzoóticos. O diagnóstico de borreliose pode ser realizado em animais vivos através de esfregaços sanguíneos periféricos corados pelo *Giemsa*.

Entretanto, os agentes só são detectáveis em casos de alta espiroquetemia (MATTON; MELCKEBEKE, 1990). Esfregaços também podem ser feitos a partir de fragmentos de tecidos do carrapato como intestino, glândula salivar e ainda hemolinfa, corados também com *Giemsa*, sendo esta técnica muito utilizada no estudo de *B. theileri* no carrapato (SMITH et al., 1978).

A habilidade na observação microscópica pelo pesquisador é importante dado o grande pleomorfismo das borrelias (ABERER; DURAY, 1991).

Na impossibilidade deste, o diagnóstico deve ser estabelecido com o auxílio de ensaios imunológicos (JOBE et al., 1993). O teste de ELISA-i tem sido amplamente empregado em estudos soroepidemiológicos na pesquisa de anticorpos da classe IgG anti-*Borrelia* spp. em muitas espécies animais e seres humanos (MAGNARELLI et al., 1984).

O diagnóstico seguro da borreliose está intimamente associado à qualidade do ensaio. O teste de ELISA-i tem sido o mais empregado e recomendado, no entanto, devem ser estabelecidos para cada laboratório os padrões de controle adequado, com o título mínimo e ponto de corte seguro. Os kits comerciais para diagnóstico da borreliose, em função de muitas reações cruzadas, sempre que possível, devem ser evitados (MAGNARELLI et al., 1987).

A técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) é a técnica que apresentam maior sensibilidade e especificidade, pois garante o resultado específico através da amplificação do ácido desoxirribonucléico do agente etiológico envolvido na infecção.

Esta técnica tem sido empregada em fluidos e tecidos de animais e humanos e em fragmentos de carrapatos (LIENBLING et al., 1993; MOTER et al., 1994, ZBINDEN et al., 1994), estando ainda relacionada às manifestações clínicas e respostas sorológicas (KARCH et al., 1994, MOURITSEN et al., 1996). A desvantagem desta, no entanto, é o custo muito oneroso em equipamentos e reagentes, quando comparado aos testes sorológicos.

As reações cruzadas têm sido descritas entre *B. burgdorferi* e *Leptospira interrogans*, com algumas variantes sorológicas, entretanto, estas reações ocorrem em alguns laboratórios e em outros não, dependendo do preparo do antígeno e do ensaio empregado (MITCHELL et al., 1994). Tem sido reportada e com certa frequência as reações cruzadas entre os membros do gênero *Borrelia*, principalmente nos bovinos (DONOGHUE; VAN VEEN, 1989). Muitas reações cruzadas têm sido descritas em técnicas, como a aglutinação, nos quais *Borrelia* spp. reage com *Treponema* spp. e com *Leptospira* spp. (BAKER-ZANDER; LUKERHART, 1984).

Para se evitar estas reações cruzadas entre antígenos recomenda-se a utilização de antígenos heterólogos.

A epidemiologia das borrelioses em animais e no homem apresenta características variadas de acordo com as regiões geográficas devido a existência de distintas espécies, e

cepas de *Borrelia*, bem como de carrapatos vetores, de interações vetor-patógeno e de ecossistemas ecológicos distintos (BENNETT, 1995).

Os animais domésticos são competentes reservatórios de *Borrelia* spp. no ambiente domiciliar (MAGNARELLI et al., 2004), contudo fazem-se necessários estudos fisiográficos com o fim de se estabelecer a situação regional da enfermidade.

O presente trabalho teve por objetivo investigar em bovinos provenientes das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, a soroprevalência de anticorpos da classe IgG, anti-*Borrelia* spp. e detectar fragmento de DNA do agente através das técnicas de ELISA-i e PCR, respectivamente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Procedimentos laboratoriais

2.2.1 Obtenção do antígeno para *Borrelia* spp.

Para produção do antígeno de *B. burgdorferi* foi utilizado o meio Barbour-Stoenner-Kelley (BSK) (Sigma-Aldrich Chemical®) e a cepa G39/40 de *B. burgdorferi* sensu stricto de origem norte-americana mantida em nitrogênio líquido no Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro.

Inicialmente, foram separados cinco tubos de centrífuga de 15mL e seis frascos de 50mL estéreis, onde foram aliqüotados 3mL e 45mL do meio BSK, respectivamente.

A amostra da cepa de *B. burgdorferi* criopreservada em glicerol 80% e congelada em nitrogênio líquido foi reativada adicionando 0,5mL da amostra em 3mL de BSK e, em seguida, incubada em estufa a 33°C por 72 horas. No final do terceiro dia, o cultivo foi observado em microscópio invertido (Olympus BX41) para avaliar a qualidade do cultivo em termos quantitativos e mobilidade das espiroquetas.

Tendo sido observada uma boa multiplicação de espiroquetas, foi realizada a lavagem do cultivo para retirada do criopreservante e para melhorar o desempenho do crescimento. No final desta etapa, foram repicados 0,5mL do cultivo de reativação em um novo tubo com 3mL de BSK, mantido em estufa durante 72 horas e posteriormente avaliado conforme supracitado. Esta etapa foi repetida por mais duas vezes, sendo que o último repique foi feito em dois tubos, sendo cada um com 3mL do meio BSK.

Na etapa seguinte, foi realizado o cultivo propriamente dito, retirando 1mL do último repique para cada tubo contendo 45mL de meio BSK. Os tubos foram incubados a 33°C durante 168 horas, e em seguida, observados a olho desarmado quanto à acidificação do meio através da mudança de coloração, indicando que houve uma multiplicação máxima das espiroquetas.

Da forma sequencial, os tubos contendo o cultivo foram centrifugados a 14.000 rpm, por 50 minutos a 4°C. Retirado o sobrenadante, os pellets foram dissolvidos em solução tampão salino fosfatado (PBS) com 0,001M MgCl₂.6H₂O pH 7,4 (PBSMg).

Os pellets dissolvidos foram reunidos em um único tubo e lavados com PBSMg por centrifugação (14.000 rpm por 50 minutos, a uma temperatura de 4°C), por três vezes. Após a última lavagem, o pellet foi ressuspensionado em 5mL de PBSMg e submetido à sonicação (Fisher Sonic Dismembrator, modelo 300, Dynatech), por 10 minutos, fracionados em 20 ciclos de 30 segundos de sonicação, 80% de potência com 30 segundos de intervalo.

O produto resultante da sonicação foi filtrado em membrana de 0,45µm, obtendo-se assim o extrato total de antígeno, o qual foi aliqüotado em tubos de 0,2mL e armazenado a -20°C até o momento do uso (GRODZICKI; STEERE, 1988).

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

2.2.2 Obtenção do soro controle positivo para *Borrelia* spp.

O soro controle positivo foi obtido a partir de inoculação em um bezerro de 50 dias de idade, aparentemente sadio, com 36kg de peso vivo, originário do setor de reprodução animal do Instituto de Zootecnia, da Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro.

Foram realizadas 3 inoculações, com intervalos de 15 dias, com antígeno inativado de *B. burgdorferi* cepa 39/40 norte-americana por via subcutânea, com agulhas e seringas estéreis, na dose de 1mg/kg de peso vivo sem adição de adjuvante. Foram realizadas coletas semanais de sangue para obtenção de soro totalizando 15 amostras que foram armazenados em freezer a -20°C até momento dos exames sorológicos.

A escolha do soro positivo mais adequado ao ensaio foi feito através do teste de ELISA-i, onde se pesquisou a presença de anticorpos da classe IgG anti-*B. burgdorferi*. Os soros que apresentaram densidades ópticas satisfatórias com no mínimo 3 vezes o valor da linha de corte, foram escolhidos para serem usados como controles positivos dos testes.

2.2.3 Obtenção de controle negativo para *Borrelia* spp.

Os controles negativos para *Borrelia* spp. foram coletadas amostras sanguíneas de bezerros recém-nascidos que ainda não tinham ingerido o colostro no rebanho da Empresa de Pesquisa Agro-Pecuária do Estado do Rio de Janeiro (Pesagro), sediada no Município de Seropédica.

2.3 Teste de Ensaio de Imunoadsorção Enzimático indireto (ELISA-i)

O teste de ELISA-i para *Borrelia* spp. foi realizado de acordo com a técnica descrita por Machado et al. (1997) para o sistema de *Babesia bovis*, com pequenas modificações.

2.3.1 Descrição da reação

À cavidade das microplacas de fundo plano (Costar 3590, Corning®, NY, USA) foram adicionados 100µL de antígeno solúvel de *B. burgdorferi*, por poço diluído em sua concentração ótima de reatividade em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M pH 9,6. Após a incubação, durante 12 horas em câmara úmida a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por cinco lavagens consecutivas com tampão PBS 0,01M pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 80.

As placas foram bloqueadas com PBSTween 80, acrescido de 6% de leite em pó desnatado de marca molico, em câmara úmida a 37°C por uma hora e trinta minutos.

Após uma nova lavagem para remoção do agente bloqueante, foram adicionados, 100µL dos soros testes, soros controles positivos e negativos, nas diluições ideais de uso em PBSTween 80, contendo 5% de leite em pó desnatado molico.

As microplacas foram incubadas a 37°C, durante uma hora e trinta minutos em câmara úmida e a seguir, lavada conforme descrito anteriormente. Uma quantidade de 100µL do conjugado IgG de coelho anti-IgG bovina ligado a alcalina fosfatase (Sigma-Aldrich Chemical®) na diluição de 1:5000 em PBSTween 80, acrescido de 5% de leite em pó desnatado, marca molico foram adicionados a cada cavidade da placa, seguindo-se uma nova incubação e lavagem, tal como anterior.

O substrato revelador da enzima fosfatase alcalina, p-nitro-fenil-fosfato de sódio (PNPP) (Sigma-Aldrich Chemical®), diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8, foi adicionado, incubando-se a reação por 45 minutos a temperatura ambiente de laboratório. Decorrido esse período, a leitura da reação foi realizada em um leitor de micro-placas de ELISA-i (Labsystems iEMS Reader MF) sob comprimento de onda de 405nm.

O ponto de corte do teste de ELISA-i correspondeu a duas vezes e meia (2.5) o valor médio das densidades ópticas dos soros utilizados como controles negativos.

A atividade imunológica de cada soro testado foi calculada mediante determinação do valor A/P (amostra em relação ao positivo), considerando os soros controles negativo e positivo, utilizando a seguinte equação matemática descrita por Machado et al. (1997).

$A/P = (a \text{ média da absorvância da amostra teste} - a \text{ média da absorvância dos soros controle negativos}) / (pela \text{ média da absorvância dos soros controles positivos} - a \text{ média absorvância dos soros controles negativos})$.

2.4 Extração do DNA do controle positivo

Para a obtenção do controle positivo para as reações da PCR foi feita a extração de DNA a partir de uma amostra de cultivo de células de *B. burgdorferi sensu stricto* previamente mantida em nitrogênio líquido no Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária da UFRRJ.

A concentração e a pureza do DNA foram obtidas através de espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop® (Thermo Cientific).

2.4.1 Reação de amplificação para *Borrelia* spp.

Os pares de oligonucleotídeos utilizados foram baseados na sequência do gene 16S rRNA de *Borrelia* spp. (RICH et al., 2001). Foram utilizados como primers os oligonucleotídeos seguintes:

Primer Forward 262 pb { *flgE* F (5'-CAA GTC CTC CGG GAT TCA TA-3')
Primer Reverse 262 pb { *flgE* R (5'-TTG GGT GCA AAT GTA GGT GA-3')

Os quais codificam para a sequência de DNA da região 16S rRNA e que flanqueiam um fragmento de 262 pares de bases.

As reações de amplificação foram realizadas em volume total de 25µL, empregando-se a seguinte mistura: 17,05µL de água ultra pura DEPC, 2,5µL do tampão da enzima, 0,75µL de MgCl₂ (50mM) e concentração de 1,5mM, 0,5µL de dNTPs (10mM) e concentração de 0,2mM, 0,5µL de primers Forward e Reverse (10mM) com concentração de 0,2mM, 0,2µL de platinum *Taq* DNA Polimerase 5U, concentração de 1U e 3µL de DNA teste.

A preparação do mix de PCR foi realizada sempre em fluxo laminar (Trox® Technik), previamente descontaminado com luz ultravioleta durante 15 minutos.

As amplificações foram processadas no termociclador Mastercycler gradiente, marca Axygen®. O programa de amplificação consistiu de um passo de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 10 ciclos com temperatura de desnaturação de 95°C por 20s, temperatura de anelamento começando em 65°C com decréscimo de 0,5°C a cada ciclo e terminando em 61°C por 25s em cada ciclo, temperatura de extensão de 72°C por 25s, seguido de 30 ciclos com temperatura de desnaturação de 95°C por 20s, anelamento a 60°C por 25s, extensão a 72°C por 25s e extensão final a 72°C por 5 minutos. Em função do aparecimento de amplificações inespecíficas realizou-se uma reação da PCR touchdown.

As reações foram realizadas em placas de poliestireno de 96 poços, código 000032, Ref. PCR-96M₂. HS-C, Lot.100101-138, Axygen Scientific Inc. CA-USA.

2.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Após as reações de amplificação os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal, em gel de agarose 1% contendo 0,5µg/mL de brometo de etídeo, em tampão de corrida TAE (40mM Tris-acetato, 2 mM EDTA pH 8,0).

Um volume de 10µL de cada amostra, acrescido de 2µL de tampão de amostra, azul bromofenol foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada a 90V por 1 hora e para a determinação do tamanho dos produtos amplificados, foi utilizado um marcador de peso molecular de 1kb ladder, Ludwig.

Os produtos da PCR foram visualizados e fotografados em transluminador de luz ultravioleta acoplado a um aparelho analisador de imagens (L PIX TOUCH).

2.6 Determinação da sensibilidade analítica da PCR para *Borrelia* spp.

A sensibilidade analítica da PCR para *Borrelia* spp. foi avaliada por meio de diluições seriadas de um DNA positivo de uma amostra de cultivo celular de *Borrelia burgdorferi*, com concentração de espiroquetas conhecida. Desta forma, foram feitos esfregaços em lâmina, com amostra de cultivo e contagem do número de espiroquetas em microscópio invertido. Três campos foram utilizados para fazer uma média do número de células por campo. Posteriormente, foi determinado o percentual de células por meio da contagem das espiroquetas por campo, somando aproximadamente $6,665 \times 10^9$ espiroquetas/mL. Após obtenção do número das espiroquetas e considerando o volume de 200µL da amostra do cultivo celular utilizado para extração de DNA, o volume de 100µL obtido ao final da extração e o volume usado para a reação de teste de sensibilidade analítica da PCR, em 1µL de DNA foi estimada a capacidade de detecção da técnica por meio de diluições seriadas (1:10) do DNA positivo em água ultra pura DEPC (Treated water pyrogen free, DNase/RNase free, Cat. Nº75-0024, Lot. Nº 450263, USA).

2.7 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados, as amostras dos animais foram agrupadas em diferentes categorias: faixa etária (< 12 meses, > 12 a ≤ 24 meses, > 24 a ≤ 36 meses e > 36 meses), sexo (macho e fêmea) e origem geográfica (Maputo, Gaza e Inhambane). Foram feitas duas análises estatísticas diferentes.

Na primeira, foi feita uma triagem da positividade das variáveis independentes pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ou exato de Fisher a nível de significativa de 5%. Todas aquelas variáveis que apresentaram associação significativa foram incluídas numa nova análise de modelo de regressão logística para construir um modelo multivariado.

O modelo multivariado de regressão logística foi aplicado para análise dos resultados sorológicos nas variáveis independentes (faixas etárias e origem geográfica das amostras) em função do resultado sorológico. Para este propósito os resultados foram analisados em nível dicotômico qualitativo (negativo = 0 e positivo = 1).

As chances de ocorrer foram calculadas para as variáveis independentes que apresentaram diferença significativa na análise de regressão logística.

Também foi utilizado o teste de McNemar para cálculo do χ^2 dos pares discordantes entre o teste de ensaio de imunoadsorção enzimático indireto (ELISA-i) e a reação em cadeia de polimerase (PCR). Todas as análises foram realizadas usando-se o programa estatístico e computacional Rstudio e BioEstat, versão 4.0 (AYRES et al., 2000).

3 RESULTADOS

No presente estudo, das 809 amostras de soros de bovinos, avaliadas pelo teste de ELISA-i, 85,9% (n = 695) apresentaram anticorpos da classe IgG contra *Borrelia* spp. e as frequências de animais sororeagentes para os fatores estudados (idade, sexo e origem geográfica das amostras), estão expostas na (Tabela 18). Diferença significativa no teste χ^2 (p<0,05) foi observada no grupo etário menor de 12 meses com relação aos demais grupos etários, demonstrando uma menor exposição ao agente nesta faixa etária.

Em relação ao sexo, 88,9% (n = 440) das fêmeas e 81,2% (n = 255) dos machos, foram soropositivos. Não houve diferença significativa entre ambos os sexos (p>0,05), demonstrando que a infecção é independente ao fator sexo.

Tabela 18. Frequência de anticorpos da classe IgG contra *Borrelia* spp., detectados pelo ensaio de imunoadsorção enzimático indireto em soros de bovinos nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, 2010.

Variáveis	Número de amostras	Positividade	
		Positivas	%
Prevalência	809	695	85,9
Idade (meses)			
< 12	114	81	71,1 ^a
> 12 a ≤ 24	115	104	90,4 ^b
> 24 a ≤ 36	118	107	90,7 ^b
>36	462	403	87,2 ^b
Sexo			
Fêmea	495	440	88,9 ^a
Macho	314	255	81,2 ^a
Maputo	175	148	84,6^A
Chicochane	48	46	95,8 ^a
Chobela	79	67	84,8 ^b
Changalane	48	35	72,9 ^b
Gaza	450	389	86,4^A
Mazivila	104	99	95,2 ^a
Macarretane	47	41	87,2 ^a
Pontinha	136	110	80,9 ^a
Macalawane	163	139	85,8 ^b
Inhambane	184	158	85,9^A
Chitsuleta	61	60	98,4 ^a
Nhamasso-Chambule	59	49	83,1 ^a
Chissibuca	64	49	76,6 ^a

N: número de amostras coletadas por fator, n: número de amostras positivas; Valores da mesma coluna seguidos por letras maiúsculas e minúsculas não diferem entre si pelo teste χ^2 ou Exato de Fisher a 5% de significância.

Com relação à origem geográfica, observou-se que 84,6% (n = 148), 86,4% (n = 389) e 85,9% (n = 158) dos bovinos das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane foram soropositivos, respectivamente (Tabela 18). Não foi observada diferença significativa

($P > 0,05$), demonstrando que a infecção por *Borrelia* spp. em bovinos é homogênea na região estudada. A soroprevalência encontrada caracteriza a Região Sul de Moçambique como uma área de estabilidade enzoótica para *Borrelia* spp.

Com relação a frequência de bovinos sororreagentes para *Borrelia* spp. em cada localidade da coleta foi observado diferença significativa dentro da mesma província (Tabela 18).

No entanto, a localidade de Chitsuleta no Distrito de Zavala, pertencente à província de Inhambane teve a maior frequência de animais soropositivos, com 98,4% ($n = 60$), seguido da localidade de Chicochane pertencente ao Distrito da Moamba, na província de Maputo com 95,8% ($n = 46$) de soropositividade. A menor porcentagem de animais soropositivo foi de 72,9% ($n = 35$), observada na localidade de Changalane no Distrito da Namaacha, também pertencente a província de Maputo.

As razões de chances nas variáveis independentes quanto a faixa etária e a origem geográfica dos animais, analisadas no modelo multivariada para *Borrelia* spp. estão expostos na (Tabela 19).

Das 809 amostras de soros avaliadas pelo teste de ELISA-i, 480 amostras delas foram avaliadas pela PCR, destas 3,8% ($n = 18$) foram positivas para *Borrelia* spp. Este resultado comprova a infecção de bovinos por esta bactéria na Região Sul de Moçambique, tendo apresentado baixa frequência de positividade nas três províncias estudadas.

Tabela 19. Análises da regressão logística das variáveis independentes em relação ao teste de ensaio de imunoadsorção enzimático indireto, para *Borrelia* spp. em bovinos segundo a faixa etária e a origem geográfica, Região Sul de Moçambique, 2010.

Variáveis Independentes	Número de amostras	Positividade				
		n	%	OR	IC a 95%	p-valor
Idade (meses)						
< 12	114	81	71.1	1		
> 12 a ≤ 24	115	104	90.4	8.68	[3.97 a 18.98]	0.000
> 24 a ≤ 36	118	107	90.7	9.97	[4.52 a 21.99]	0.000
> 36	462	403	87.2	11.83	[6.29 a 22.25]	0.000
Localidade						
Chitsuleta	61	60	98.4	1		
Nhamaso-Chambule	59	49	83.1	0.11	[0.01 a 0.92]	0.01
Chissibuca	64	49	76.6	0.07	[0.01 a 0.56]	0.01
Mazivila	104	99	95.2	0.26	[0.03 a 2.35]	0.05
Macarretane	47	41	87.2	0.07	[0.01 a 0.58]	0.05
Pontinha	136	110	80.9	0.05	[0.01 a 0.39]	0.001
Macalawane	163	139	85.8	0.23	[0.03 a 2.16]	0.01
Chicochane	48	46	95.8	0.19	[0.02 a 1.62]	0.01
Chobela	79	67	84.8	0.43	[0.04 a 5.17]	0.05
Changalane	48	35	72.9	0.11	[0.01 a 0.96]	0.05

N = Número total de amostragem fator; n = número de amostras positivas; OR = Odds Ratio ou chance de ocorrer; IC = intervalo de confiança.

Os resultados da PCR também foram agrupados por faixa etária (<12 meses, >12 a ≤ 24 meses, > 24 a ≤ 36 meses, e > 36 meses), origem geográfica das amostras (Maputo, Gaza e Inhambane) e sexo (macho e fêmea), (Tabela 20). Não foram observadas diferenças significativas no teste qui-quadrado ou exato Fisher ($p > 0,05$), a 5% de significância em todos os fatores estudados.

As amostras positivas apresentaram, após a reação de amplificação e leitura em gel de agarose a 1%, banda visível na altura de 262 pares de base, concordando com o controle positivo para o agente em análise como indicado na (Figura 11).

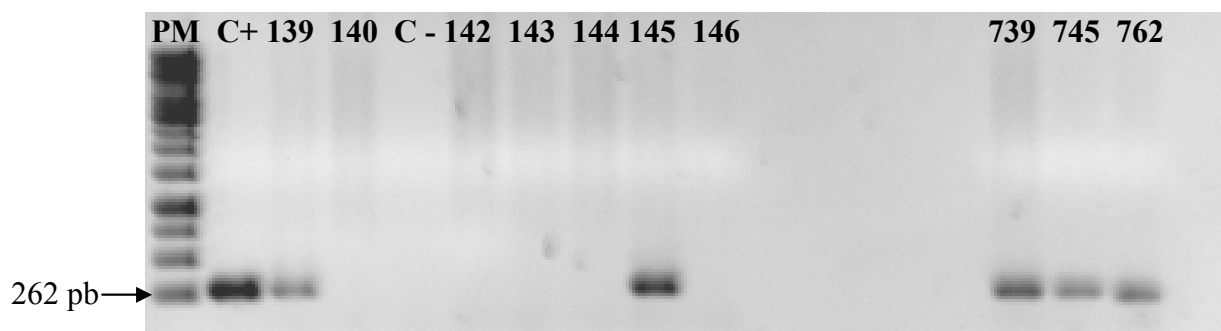


Figura 11. Eletroforese de gel em agarose 1%, dos produtos amplificados de DNA de *Borrelia* spp. pela técnica de PCR, em sangue de animais naturalmente infectados. **PM:** Peso Molecular, **C+:** controle positivo, **C-:** controle negativo, de 139 a 762 são amostras testes. A banda de 262 pb corresponde ao produto de amplificação da sequência de *Borrelia* spp.

Tabela 20. Frequência de DNA da *Borrelia* spp. em bovinos das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique detectada pela reação em cadeia da polimerase e fatores associados, 2010.

Variáveis	Número de amostras	Positividade	
		n	%
Prevalência	480	18	3,8
Idade (meses)			
<12	62	2	3,2 ^a
>12 a ≤ 24	83	2	2,4 ^a
>24 a ≤ 36	75	5	6,7 ^a
>36	260	9	3,5 ^a
Sexo			
Fêmeas	304	11	3,6 ^a
Machos	176	7	4,0 ^a
Províncias			
Maputo	119	9	7,6 ^a
Gaza	205	5	2,4 ^a
Inhambane	156	4	2,6 ^a

N = número de animais coletados por fator, n = número de amostras positivas para *Borrelia* spp. Os valores da mesma coluna seguidas da mesma letra, não apresentam diferença significativa entre os fatores estudados no teste χ^2 ou exato de Fisher ($p > 0,05$).

A análise comparativa dos resultados obtidos pelo teste de ELISA-i e PCR, demonstrou haver uma concordância em 3,3% ($n = 16$) dos resultados para *Borrelia* spp. Por outro lado, houve discordância em 0,8% ($n = 360$) e 0,4% ($n = 2$) das amostras pelo ELISA-i e PCR, respectivamente, conforme demonstrado na (Tabela 21).

Tabela 21. Detecção sorológica e molecular de anticorpos da classe IgG e de DNA para *Borrelia* spp. por ensaio de imunoadsorção enzimática indireta e reação em cadeia da polimerase, 2010.

PCR	ELISA-i		Total	
	+	-		
<i>Borrelia</i> spp.	+	16	2	18
	-	360	102	462
Total		376	104	480

Teste de McNemar com χ^2 dos pares discordantes igual a 352,0691 e $p < 0,0001$

4 DISCUSSÃO

Nos estudos soroepidemiológicos têm sido utilizados o ensaio de imunoadsorção enzimático indireto como principal método de investigação por apresentar alta sensibilidade e especificidade (MAGNARELLI et al., 1984; MAGNARELLI; ANDERSON, 1988).

Os ensaios imunoenzimáticos para borrelioses são padronizados pelos laboratórios que pretendem proceder à investigação de um determinado agente etiológico, devido às possíveis variações antigênicas fisiográficas, não sendo conveniente o uso de kits comerciais para diagnóstico (CALLOW, 1967).

A análise dos resultados obtidos demonstrou que as três províncias estudadas, Maputo, Gaza e Inhambane apresentaram elevada frequência de animais soropositivos para o agente. As frequências de positividade não apresentaram diferenças significativas entre si no teste qui-quadrado ou exato de Fisher (χ^2) ($p > 0,05$).

Com relação à faixa etária foi observada diferença estatisticamente significativa no grupo de animais menores de 12 meses, quando comparada aos demais grupos etários, o que demonstra menor exposição ao agente nos animais em crescimento (Tabela 18).

Na região da África Austral, estudos realizados em bovinos, no Botswana, demonstraram a presença de infecção mista de *B. theileri* e *Theileria mutans* em sangue de bovinos, (SHARMA et al., 2000). Na África Ocidental, no Senegal, foram relatados 24 casos de borreliose em bovinos, Trape et al. (1996). Estes estudos demonstram que o agente etiológico da borreliose está presente na África e circula entre diferentes regiões geográficas do continente, infectando diferentes espécies de animais domésticos.

Todas as criações de bovinos participantes do presente estudo mantinham conjuntamente bovinos com outras espécies de animais domésticos, além do contato esporádico com animais silvestres. Estas observações podem ter relevância, pois estudos realizados em outras regiões geográficas relatam a presença de anticorpos anti-*Borrelia* e fragmentos de DNA do parasita em sangue e carrapatos de animais silvestres (ANDERSON et al., 1986; GILL et al., 1993; McLEAN et al., 1993b)

Além dos animais domésticos, animais silvestres também podem fazer parte do ciclo de manutenção de *Borrelia* spp. em determinados ecossistemas de África. Na presente pesquisa foram obtidas informações valiosas, sobre a ocorrência de contato e a utilização da mesma área de pastagem entre bovinos e animais silvestres por meio do questionário investigativo. Esses dados revelaram que em 100% das criações havia proximidade com áreas de florestas e algum tipo de contato com animais silvestres, principalmente, herbívoros e bovinos silvestres.

As análises sorológicas não descartam a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com outras espécies de *Borrelia* spp., principalmente, *B. theileri* (ROGERS et al.,

1999), e outras espécies de espiroquetas, em especial com *Treponema* sp. (MAGNARELLI et al., 1987).

Esta possibilidade pode resultar em porcentagens altas de animais soropositivos ao teste de ELISA-i utilizando antígeno bruto de *B. burgdorferi*, cepa norte-americana. Embora, nestas condições, a maioria dos registros de reações cruzadas relate pouca significância (MAGNARELLI; ANDERSON, 1988, ROGERS et al., 1999).

Os resultados do presente estudo sobre *Borrelia* spp. em bovinos mostraram frequências altas, acima de 75%. Contudo, não têm sido observados casos clínicos de doença relacionados ao agente etiológico *Borrelia* spp. A análise das frequências de animais soropositivos em relação ao sexo dos animais demonstrou não haver diferença estatística entre machos e fêmeas ($p > 0,05$) (Tabela 18). Este resultado demonstra que o fator sexo não interfere na preferência alimentar dos carrapatos vetores muito menos aos fatores ambientais que predispõe a infecção por espiroquetas do gênero *Borrelia*.

A faixa etária demonstrou ser um fator importante na frequência de soropositividade detectada para o agente estudado (Tabela 18). Bovinos com idade inferior a 12 meses apresentaram menor frequência de soropositividade para *Borrelia* spp., tendo sido observado um aumento gradual do número de animais soropositivos desde a faixa etária menor que 12 meses até maior que 36 meses.

A explicação deste comportamento, possivelmente, estará relacionada com o fortalecimento do sistema imune e conseqüentemente da sua capacidade de resposta à infecção pelo agente etiológico, assim como a possibilidade de reinfecção.

A análise dos resultados sorológicos segundo a origem geográfica das amostras demonstrou que todas as províncias (Maputo, Gaza e Inhambane), apresentaram frequências de soropositividade próximas para o patógeno estudado, e não foi observada diferença significativa no teste qui-quadrado ($p > 0,05$), demonstrando certa homogeneidade na distribuição do patógeno.

A interação entre animais domésticos e silvestres pode ser um dos fatores epidemiológicos que contribuiu para a obtenção de resultados de elevada prevalência para este agente.

Os bovinos podem atuar como reservatórios de *Borrelia* spp. assim, fazem-se necessários estudos fisiográficos a fim de melhor conhecer a soroprevalência da borreliose bovina. A epidemiologia e a apresentação clínica das borrelioses são variadas de acordo à região devido à existência de espécies e cepas distintas, carrapatos vetores, interação vetor-patógeno e ecossistemas (BARANTON et al. 1992).

Os resultados sorológicos que apresentaram significância no teste χ^2 foram também analisados pelo modelo de regressão logística multivariada tendo sido categorizados em (negativa = 0 e positiva = 1). Neste modelo foram incluídas todas as faixas etárias e a origem geográfica das amostras por localidade.

Quando as variáveis independentes foram submetidas à análise multivariada, com relação à faixa etária foi observada uma associação significativa em todos os grupos etários ($p = 0.000$), (Tabela 19). Com relação à localidade foi observada uma forte associação estatística apenas na localidade da Pontinha no Distrito de Xai-Xai, na província de Gaza ($p = 0.001$) e nas localidades de Chitsuleta, Nhamasso-Chambule e Chissibuca no Distrito de Zavala, na província de Inhambane ($p = 01$). Nas restantes localidades não foi observada uma associação significativa ($p > 0.05$). O fator de risco de infecção por agentes transmitidos por carrapatos em bovinos para *Borrelia* spp. estava presente em relação à faixa etária. Foi observado um Odds Ratio (OR) que foi fortemente afetado pela idade (Tabela 19).

Os animais da faixa etária maior de 12 meses e menor ou igual a 24 meses apresentaram 8.68 vezes mais chances de se infectarem e esta relação foi aumentando com relação aos grupos etários mais velhos e que os animais maiores de 36 meses apresentaram

11.83 vezes mais chances de se infectarem com agentes etiológicos da borreliose bovina. A faixa etária constitui um forte fator de risco para infecção por agentes da *Borrelia* spp. na região estudada.

Das 480 amostras analisadas pelo teste de ELISA-i e PCR, foram observadas positivities de 78,3% (n = 376) e 3,8% (n = 18), respectivamente. Houve diferença significativa pelo teste qui-quadrado ($p < 0,05$) entre o resultado sorológico e molecular para *Borrelia* spp. (Tabela 21). Acrescenta-se a isso, que apenas 2 amostras negativas no teste de ELISA-i, foram positivas na PCR, sugerindo tratar-se de primo-infecção.

Não foram encontrados relatos sobre diagnóstico de borreliose em bovinos por métodos sorológicos ou moleculares na Região Sul de Moçambique.

No presente estudo, o número de bovinos positivos na PCR não mostrou associação com relação ao sexo, origem geográfica das amostras e faixa etária dos animais, demonstrando que a chance da infecção foi igual para todos os fatores analisados.

Na presente pesquisa não foram observados animais com sinais clínicos sugestivos da doença durante o trabalho de campo, o que demonstra a necessidade da realização de estudos em outras regiões do país, no qual existam condições climáticas diferenciadas que possam facilitar ou não a proliferação e disseminação de bioagentes responsáveis pela transmissão da enfermidade.

Em termos práticos, os resultados sorológicos encontrados na presente pesquisa indicam uma condição de estabilidade enzoótica na região estudada, o que indica um baixo risco de casos de surtos da borreliose bovina.

Os resultados deste estudo fornecem informações importantes que pode ser utilizadas pelos gestores da pecuária nacional e para a compreensão da situação sanitária bovina no país, além de auxiliar no planejamento de futuros estudos e na educação zoo-sanitária dos criadores de bovinos no país. Nestas circunstâncias, maiores estudos fisiográficos são necessários e justificados, a fim de monitorar os rebanhos pecuários e identificar outros fatores que possam constituir um risco ao desenvolvimento da indústria pecuária nacional.

5 CONCLUSÃO

Os agentes da borreliose bovina estão circulando nos rebanhos bovinos da Região Sul de Moçambique e estes devem ser incluídos no diagnóstico diferencial com outras doenças dos bovinos transmitidos por carrapatos. Este constitui o primeiro relato de ocorrência de agente de borreliose em bovinos na Região Sul de Moçambique.

6 Comparação entre as prevalências de *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale* e *Borrelia* spp. entre os bovinos da Região Sul de Moçambique e nas províncias estudadas

As prevalências observadas entre os bovinos na Região Sul de Moçambique para *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* e *Borrelia* spp. apresentou diferença significativa (Tabela 22).

Na província de Gaza foi observada uma menor prevalência de animais soropositivos para *B. bigemina* e *A. marginale* (64,7% e 68,4%), respectivamente. Diferença significativa foi observada nesta província com relação estes agentes. Também foi observada diferença significativa entre as prevalências de *Borrelia* spp. e a *B. bovis*, na mesma província.

Nas províncias de Maputo e Inhambane prevalências de bovinos soropositivos nos agentes estudados foram iguais ou superiores a 75%, o mínimo necessário para que uma determinada região seja classificada como estável (MAHONEY, 1975). Na província de Maputo não foi observada diferença significativa entre todos os agentes estudados.

Ao observar as características do relevo da província de Gaza e as características peculiares de temperatura e umidade relativa do ar, associado ao controle intensivo de carrapatos estes aspectos podem ter influenciado na biologia dos vetores, principalmente no número de gerações dos carrapatos, diminuindo a pressão de infecção (MAHONEY; ROSS, 1972; MAHONEY; MIRRE 1979) e assim determinando as menores prevalências de *B. bigemina* e *A. marginale* nesta província.

Tabela 22. Prevalências da soropositividade através do teste ELISA indireto para *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale* e *Borrelia* spp. dos bovinos das províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique e respectivas províncias, 2010.

Agente etiológico	Províncias											
	Região Sul			Maputo			Gaza			Inhambane		
	N	n	%	N	n	%	N	n	%	N	n	%
<i>Babesia bigemina</i>	809	581	71,8 ^a	175	148	84,6 ^a	450	291	64,7 ^a	184	142	77,2 ^a
<i>Babesia bovis</i>	809	620	76,6 ^a	175	147	84,0 ^a	450	335	74,4 ^b	184	138	75,0 ^{ab}
<i>A. marginale</i>	809	619	76,5 ^a	175	156	89,1 ^a	450	308	68,4 ^{ac}	184	155	84,2 ^{bc}
<i>Borrelia</i> spp.	809	695	85,9 ^b	175	148	84,6 ^a	450	389	86,6 ^c	184	158	85,9 ^c

N: número de amostras coletadas na região e nas províncias, n: número de amostras positivas. Valor da mesma coluna seguido da mesma letra não apresenta diferença significativa no teste χ^2 ou Exato de Fisher a 5% de significância.

Dentre as características predominantes nas criações de bovinos da Região Sul de Moçambique, ressalta-se o aspecto racial, constituído por bovinos na sua maioria sem raça definida, mas todos são pertencentes ao tronco *Bos indicus*. O sistema de criação é extensivo. Apesar de grande parte dos criadores afirmarem possuir assistência veterinária através dos técnicos da extensão rural da rede pública (98,2%), estes são funcionários públicos e estão lotados nos Serviços Distritais de Atividades Econômicas (SDAE), distantes dos criadores e o atendimento na maioria das vezes é feito de forma emergencial para casos clínicos de doença

e quando são solicitados, não existindo um programa profilático e de prevenção de doenças em rebanhos.

Do ponto de vista das características dos criadores e sua percepção sobre a produção pecuária foi observado que mais de metade tem muita experiência na produção pecuária, poucos se atualizam em fontes com bases científicas no sentido de conhecer os problemas do seu cotidiano com relação a sua atividade pecuária. Foi observado que 100% dos criadores consideram as doenças transmitidas por carrapatos como as principais e os carrapatos dos bovinos como os ectoparasitos que impedem o desenvolvimento da atividade, mas ficou claro nas entrevistas que eles pouco conhecem sobre formas adequadas de prevenção e controle de carrapatos.

Muitos são os desafios que os criadores de bovinos na Região Sul de Moçambique enfrentam. Estes desafios vão desde sua adaptação a atual realidade na produção pecuária no país, aos desafios sanitários dos rebanhos, onde se enquadram as doenças transmitidas por carrapatos que são fatores limitantes da atividade pecuária.

O comprometimento político e a determinação do poder público são necessários para que o país possa sair da dependência, tem-se reconhecer a importância social e econômica do setor agro-pecuário para a região estudada em particular e no país em geral; a extensão veterinária tem na assistência uma oportunidade para fazer a diferença em prol do desenvolvimento de da pecuária, os pequenos criadores podem mudar a realidade da pecuária nas províncias estudadas, bem como da região no cenário nacional. Com o desenvolvimento do setor agrário, o ganho imediato é a diminuição do êxodo rural de força de trabalho para os centros urbanos principalmente, os pequenos criadores de bovinos e o fortalecimento da economia e condição social e cultural da população humana.

7 DISCUSSÃO GERAL

É indiscutível que as doenças transmitidas por carrapatos representam um dos mais importantes problemas na Sanidade Animal e no desenvolvimento da indústria pecuária em muitos países das regiões tropicais e subtropicais do mundo e, particularmente na maioria dos países da chamada África subsahariana.

Diversas restrições são impostas a esses países devido a ocorrência de várias doenças transmitidas por artrópodes, sendo desta forma, um fator limitante para o comércio internacional de animais de produção, melhoramento genético e em determinadas regiões inviabilizam a produção pecuária de bovinos, principalmente nos pequenos criadores sem capacidade financeira para a aquisição de produtos carrapaticidas (BOCK et al., 2004; ESTRADA-PEÑA et al., 2006; SCOLES et al., 2005; UILENBERG, 1986).

Esta realidade acaba causando altas taxas de morbidade e mortalidade em mais de 50% dos animais vindos de áreas livres para áreas endêmicas (MARTINS et al., 2008).

Em Moçambique predomina um sistema de criação tradicional constituído por pequenas criações de bovinos, sem cultura de gestão financeira da atividade, onde não há registros de movimentos nos rebanhos (nascimentos, vendas, compras, abates e mortes).

As perdas econômicas anuais são subestimadas e muitas vezes são feitas as extrapolações estatísticas referentes a estes dados o que nem sempre reflete a realidade em termos de perdas globais de toda a cadeia produtiva nacional.

O aumento da produção e produtividade na pecuária é considerado uma prioridade nacional para melhorar a subsistência dos produtores agro-pecuários e para garantir a segurança alimentar e nutricional das comunidades rurais e do país.

Com a introdução do sistema de planeamento rural participativo e a transformação do Distrito como pólo de desenvolvimento econômico foi possível incorporar elementos que contribuíram na ascendência econômica, principalmente na geração de renda familiar em áreas rurais de todo o país (TEMBUE, 2011)⁷.

Assim, qualquer abordagem direcionada ao desenvolvimento agrário em Moçambique com vista a aliviar a extrema pobreza nas comunidades rurais deve se considerar uma abordagem holística de criação animal e produção integrada de culturas alimentares e de rendimento.

Durante a implementação do Programa Nacional de desenvolvimento Agrário (PROAGRI) foi sendo introduzido de forma gradual um conceito agrário denominado “Farmer Field School” (Escola na machamba do camponês) como uma alternativa e uma nova abordagem mais participativa que envolvesse ativamente os principais atores no processo produtivo, isto é, as comunidades rurais.

Essa abordagem incluía a participação destes produtores no planeamento e no processo decisório na escolha de tecnologias adequadas e na identificação dos limitantes e condicionalismos específicos em que estes pequenos produtores agro-pecuários rurais enfrentavam no processo de desenvolvimento das suas atividades quotidianas.

Com a utilização da metodologia participativa no planeamento, muitos dos pequenos produtores agrários observaram grande impacto sobre a agricultura de subsistência nas suas comunidades. Isto ressalta a importância do controle dos ectoparasitos pelas autoridades responsáveis pela gestão da pecuária nacional em Moçambique com maior ênfase para o setor familiar.

É de salientar que a produção pecuária representa uma importante fonte de satisfação das necessidades alimentares duma parcela significativa da população moçambicana em

⁷ Comunicação pessoal

carne, leite e outros derivados de origem animal, além de ajudarem nos trabalhos de campo como nas lavouras, transporte de pessoas e mercadorias diversas através da utilização do sistema de tracção animal, também constitui a principal reserva monetária das famílias rurais de baixa no país. Na Região Sul de Moçambique principalmente nas províncias de Maputo e Gaza o bovino tem sido muito utilizado como moeda de pagamento do lobolo (dote) no casamento tradicional em sistema de uso e costumeiro moçambicano, o sistema é válido perante a legislação jurídica sobre o matrimónio em vigor na República de Moçambique Tembue (2011)⁸

Estudos epidemiológicos realizados por meio de testes sorológicos e moleculares, como o ensaio de imunoadsorção enzimático indireto (ELISA-i) e reacção em cadeia da polimerase (PCR), representam uma poderosa ferramenta conjunta para o diagnóstico preciso e investigação das infecções transmitidas por carrapatos.

Em Moçambique, informações sobre prevalência de *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale* e *Borrelia* spp. são escassas. No entanto, as informações sobre a distribuição da babesiose, anaplasmose e borreliose bovina são essenciais para a elaboração de programas estratégicas de profilaxia e controle adequada de ectoparasitos (MORZARIA et al., 1992).

O estudo realizado centrou-se nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique. A combinação de dois métodos de diagnóstico, sorológico e molecular, permitiu ter uma visão geral da infecção e da circulação desses agentes etiológicos nos rebanhos bovinos da região estudada. As técnicas de ELISA-i e PCR foram utilizadas para a detecção de anticorpos da classe IgG e DNA de parasitas dos genes 16S e 18S rRNA, específico para cada parasita estudado.

Estes métodos apresentam alta sensibilidade e especificidade e tem sido recomendados para estudos epidemiológicos (FIGUEROA et al., 1993; GOFF et al., 2006; 2008). Da análise dos resultados sorológicos foram observados 71,8%, 76,6%, 76,5% e 85,9% de animais sororeagentes para *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* e *Borrelia* spp., respectivamente, enquanto que pela PCR detectou-se 11,3%, 37,1%, 79,2% e 3,8% de animais infectados e que *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* e *Borrelia* spp., estão circulando na área estudada, respectivamente.

Estas informações poderão ser úteis para definir metodologias padronizadas para o desenvolvimento de programas nacionais de monitoramento e vigilância epidemiológica como medidas de profilaxia e controle preventivo dos agentes causadores destas doenças, uma vez que as infecções transmitidas por carrapatos poderiam ter um impacto importante no peso das perdas económicas globais.

No entanto, o sistema de controle de carrapatos nas criações estudadas se mostrou ser inadequado, pois não existe uma metodologia comum ou padrão entre os criadores no que concerne a frequência de aplicação das drogas e no cumprimento das regras básicas do manuseio dos carrapaticidas.

Além de transmissão de doenças, a infestação intensa com carrapatos pode causar uma redução significativa na produtividade dos animais. Portanto, os programas educativos aos pequenos criadores se fazem necessários para que os programas de controle de carrapatos sejam executados de forma adequada por todos os criadores da região.

Para essa abordagem se faz necessário primeiro ações educativas direcionadas aos criadores sobre a biologia dos carrapatos que transmitem diversas doenças aos animais, em Moçambique. O conhecimento das espécies de carrapatos, a competência vetorial na transmissão, a dinâmica da infecção em animais susceptíveis e o “status” imunológico são

⁸ Comunicação pessoal

fatores importantes para o entendimento sobre circulação de agentes etiológicos em uma população de animais susceptíveis (EISLER et al., 2003).

Com este conhecimento básico será possível projetar e executar modelos de estudos epidemiológicos e econômicos para a realização de estudos sobre a situação zoo-sanitário abrangente na região e no país, assim, também seria possível avaliar o impacto das várias enfermidades e programas integrados de profilaxia e controle de vetores.

Os resultados do presente estudo demonstram que muitos animais apresentaram a co-infecção de alguns agentes etiológicos analisados. Isso pode indicar que as infecções mistas de patógenos transmitidos por carrapatos pode estar associados com a perda de produtividade dos rebanhos, mesmo na condição de portador e não de doença clínica.

Esta observação é muito importante porque a maioria das medidas de controle das doenças transmitidas por carrapatos preconizam atualmente o controle de vetores de forma moderada para favorecer o desenvolvimento de estabilidade enzoótica, ou seja, um estado de equilíbrio entre o ambiente, o carrapato vetor e o hospedeiro vertebrado. Quando estes três estão em um estado de equilíbrio, a doença clínica é praticamente ausente.

Na literatura científica mais antiga, em relação ao controle de carrapatos e outros vetores observa-se que os esforços visavam a erradicação das doenças transmitidas por artrópodes em muitas partes do mundo, incluindo a região da África subsahariana, o que se provou ser impossível até o presente momento (EISLER et al., 2003; PEGRAM et al., 2000).

Nestas condições seria desejável primeiro que se avaliasse as perdas de produtividade resultantes das práticas ineficientes para o controle da população de carrapatos e outras estratégias de controle, com ênfase em outras opções de controle como a vacinação, por exemplo. Sugere-se determinar métodos que dariam o melhor retorno econômico para os criadores. Tais comparações devem ser feitas para criadores de diferentes níveis, que apresentam um número razoável de animais de raças nativas, incluindo também os sistemas comerciais, com raças geneticamente melhoradas.

Esse tipo de comparação seria muito pertinente, pois pode ter influência direta com o nível e a natureza de estabilidade endêmica para determinados agentes etiológicos presentes na região. Além disso, a realização de uma análise do custo/benefício de programas de profilaxia e controle de ectoparasitos nos rebanhos, poderia estimular determinadas práticas pelos criadores, visando uma maior rentabilidade futura da atividade.

Este estudo revelou uma alta soroprevalência na amostragem obtida na estação chuvosa. A temperatura e a umidade relativa do ar, associado ao efeito do fenômeno El Niño na região da África subsahariana tem proporcionado condições favoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência de vários artrópodes incluindo os carrapatos vetores, facilitando deste modo a transmissão de patógenos.

O efeito da Oscilação Sul do El Niño (ENSO) tem sido utilizado como modelo para o estudo de doenças tropicais humanas, especialmente a malária, no intuito de prever a ocorrência de epidemias (BOUMA; VAN DER KAAJ, 1996).

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas sobre a malária e sua associação com eventos do El Niño, mas nenhum trabalho foi reportado relacionando essa variabilidade climática com qualquer doença de importância médica veterinária em Moçambique. É um fato conhecido que a transmissão de patógenos transmitidos por carrapatos tende a ocorrer dentro dos padrões sazonais, em que o papel de chuva e a temperatura são fundamentais.

Kovats (2000) afirmou que a chuva e a temperatura foram os principais condutores dos processos biológicos através dos quais ENSO tem afetado a saúde humana. Uma variedade de vetores carregando consigo a maioria dos patógenos são expostos ao ambiente e sua densidade é influenciado pela variabilidade no tempo, que pode também afetar a forma como a doença é transmitida.

A precipitação pluviométrica atípica no primeiro trimestre de 2000 em Moçambique parece ter favorecido o aumento e surgimento de novas espécies de carrapatos que infestam animais, os quais foram reportados pela primeira vez por (DE MATOS, 2008).

Kovats et al. (2003) sugeriram existir evidências de uma associação entre risco de infestação por artrópodes com o fenômeno ENSO. Estes fatos se tornam mais robustos quando baseados em estudos temporais. Os autores avaliaram animais por um longo período de tempo e conseguiram estabelecer um vínculo entre a transmissão e à variabilidade climática.

Neste estudo não foi realizada uma associação entre a soropositividade dos agentes transmitidos por carrapatos e o efeito ENSO, mas supõe-se que possa estar a contribuir na epidemiologia das doenças transmitidas por carrapatos no sul de Moçambique.

Em qualquer estratégia de intervenção no processo produtivo de bovinos, a avaliação sobre a percepção dos criadores em relação aos problemas higiênico-sanitários nas criações se torna essencial para a inclusão de novas práticas de manejo no desenvolvimento da atividade pecuária. Este fato pode favorecer os próprios criadores, sua compreensão e aceitação para a implementação de novas práticas, garantindo a sustentabilidade dos programas.

A sustentabilidade e o sucesso da pecuária em Moçambique dependem do serviço veterinário estatal na gestão e controle de ectoparasitos e conscientização dos criadores de bovinos a adotarem um pensamento comum, o desenvolvimento do país e autosuficiência alimentar para isso, adoção de estratégias de controle de carrapatos que infestam os bovinos, animais silvestres e o homem é fundamental e prioritário em Moçambique.

A produção de alimentos de origem animal e de qualidade para o abastecimento da população é uma questão da soberania nacional.

8 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A partir dos resultados do presente estudo epidemiológico das infecções por *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale* e *Borrelia* spp. em bovinos, na Região Sul de Moçambique conclui-se:

A utilização das técnicas sorológicas e moleculares para o diagnóstico das infecções por *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* e *Borrelia* spp. possibilitou a detecção destes agentes, indicando a circulação nas criações dos pequenos criadores de bovinos do sul de Moçambique;

Os hemoparasitos *B. bigemina*, *B. bovis*, *A. marginale* e *Borrelia* spp. infectam bovinos, simultaneamente nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, na Região Sul de Moçambique;

Os agentes da borreliose devem ser incluídos no diagnóstico diferencial de outras doenças dos bovinos transmitidas por carrapatos, este constitui o primeiro relato de ocorrência de borreliose bovina em Moçambique;

Ações educativas e de conscientização para os pequenos criadores sobre a importância das doenças transmitidas por carrapatos e do uso adequado de produtos químicos e da preservação do meio ambiente e proteção individual se fazem necessárias;

A falta de diagnóstico adequado dos agentes etiológicos transmitidos por carrapatos na região estudada é um fator que favorece o uso indiscriminado de drogas terapêuticas e compromete a eficiência do tratamento;

A utilização de mão de obra familiar e a baixa escolaridade são características presentes na maioria dos criadores de bovinos na Região Sul de Moçambique.

Os resultados do presente estudo fornecem informações sobre a situação zoo-sanitária na Região Sul de Moçambique que possam ser utilizados pelos gestores da pecuária nacional no planejamento de futuras intervenções nos programas de profilaxia e controle de ectoparasitos no novo contexto da produção pecuária nacional.

9 RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados obtidos na presente pesquisa, torna-se interessante a realização de novos estudos epidemiológicos que sejam extensivos e abrangentes sobre as doenças transmitidas por carrapatos em Moçambique. Estes poderão ser planejados e executados em diferentes estações do ano com animais de diferentes graus de sangue, aptidão produtiva e faixas etárias, abrangendo todas as regiões do país. Da mesma forma, uma avaliação da relação entre as faixas etárias dos animais, raças e condições ambientais poderiam ser efetuados;

Pesquisas futuras poderão ser direcionadas para avaliação do efeito El Niño para doenças transmitidas por carrapatos em bovinos como a anaplasmoze, babesiose, borreliose entre outras.

Mais pesquisas são necessárias sobre estes importantes hemoparasitas de animais, de modo que a relação custo/benefício dos programas de controle de ectoparasitas em animais de produção seja eficaz, e que o controle estratégico seja implementado com base em conhecimentos científicos e sólidos sobre a interação hospedeiro invertebrado, vertebrado e o ambiente.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERER, E.; DURAY, P. H. Morphology of *Borrelia burgdorferi*: structural patterns of cultured borreliae in relation to staining methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 764-772, 1991.

AGBEDE, R. I.; KEMP, D. H.; HOYTE, H. M. *Babesia bovis* infection of secretory cells in the gut of the vector tick *Boophilus microplus*. **International Journal for Parasitology**, v. 16, n. 2, p. 109-114, 1986.

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

AJAYI S, A.; WILSON, A. J.; CAMPBELL, R. S. Experimental bovine anaplasmosis: clinico-pathological and nutritional studies. **Research in Veterinary Science**, v. 25, n. 1, p. 76-81, 1978.

ALFREDO, A. A. N.; JONSSON, N. N.; FINCH, T. M. NEVES, L. Serological survey of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle in Tete province, Mozambique. **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, n. 2, p. 21-131, 2005.

ALFONSO, J.; MEDINA, R.; FAZZINO, F.; CABALLERO, H. Câmbios clínicos y hematológicos em becerros infectados com *Anaplasma marginale*. **Acta Ciencia Venezolana**, v. 47, p. 50-57, 1996.

ALLSOPP, M. T.; CAVALIER-SMITH, T.; DE WAAL, D. T.; ALLSOPP, B. A. Phylogeny and evolution of the piroplasms, **Parasitology**, v. 108, n. 2, p. 147-152, 1994.

ALLEMAN, A. R., BARBET, A. F. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 270-276, 1996.

ANDERSON, J. F.; DURAY, P. H.; MAGNARELLI, L. A. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in white-footed mice and *Ixodes dammini* at Fort McCoy, Wis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 8, p. 1495-1497, 1987.

ANDERSON, J. F.; JOHNSON, R. C.; MAGNARELLI, L. A.; HYDE, F. W. Involvement of birds in the epidemiology of Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 2, p. 394-396, 1986.

ANDERSON, J.F. Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.539, p.180-191, 1988.

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

APPEL, M. J. G.; ALLAN, S.; JACOBSON, R. H.; LAUDERDALE, T. L.; CHANG, Y. F.; SHIN, S. J.; THOMFORD, J. W.; TODHUNTER, R.J.; SUMMERS, B. A. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 67, n. 3, p. 651-664, 1993.

Atlas de geografia de Moçambique, **Ministério de Educação e Cultura**, Maputo, 1980.

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

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. *BioEstat 4.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Editora Sociedade Civil Mamirauá, Belém. 272p. 2000.

BABES, M. V. Sur l'hémoglobinurie bactérienne du bouef. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences**, v. 107, p. 692-694, 1888.

BAKER-ZANDER, S.; LUKERHART, S. A. Antigenic cross-reactivity between *Treponema pallidum* and other pathogenic members of the family Spirochaetaceae. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 1, p. 116-121, 1984.

BALASHOV, Y. S. A translation of bloodsucking ticks (Ixodoidea)-vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous of the Entomological Society of America**, v. 8, n. 5, p. 159-376, 1972.

BANNOR, T. T. Babesiosis in neonatal calves: a case report. **Bulletin Animal Health and Production**, v. 24, n. 3, p. 267-269, 1976.

BARBET A. F. Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 43-9, 1995.

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

BARBOUR, A.G. Antigenic variation of a relapsing fever *Borrelia* species. **Annual Review Microbiology**, v.44, p.155-171, 1990.

BARBOZA, W. G. A.; ALMEIDA Jr, D. E.; SILVA, L. A. M.; FONSECA, A. H. Detecção de *Borrelia* sp. em gambás imunossuprimidos com ciclofosfamida. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, n.6, p.241-243, 1998.

BARANTON, G.; POSTIC, D.; SAINT GIROS, I. Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii sp. nov.*, and VS461 associated with Lyme Borreliosis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 3, p. 378-383, 1992.

BARKER, R.H. DNA probe diagnosis of parasitic infections. **Experimental Parasitology**, v. 70, n. 4, p. 494-99, 1990.

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

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

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

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

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

BERKVEN, D.L.; PEGRAM, R.G.; BRANDT, J.R. A study of the diapausing behaviour of *Rhipicephalus appendiculatus* and *R. zambeziensis* under quasi-natural conditions in Zambia. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 9, n. 3, p. 307-315, 1995.

BIANCHI, M.W.; BARRÉ, N.; MESSAD, S. Factors related to cattle level resistance to acaricides in *Boophilus microplus* tick populations in New Caledonia. **Veterinary Parasitology**, v. 112, n. 1-2, p. 75-89, 2003.

BREITSCHWERDT, E. B.; NICHOLSON, L.; KIEHL, A. R.; STEERS, C.; MEUTEN, D.J.; LEVINE, J. F. Natural infections with *Borrelia* spirochetes in two dogs from Florida. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 352-357, 1994.

BLOWEY, R.W.; SHARP, M.W.; DONE, S.H. Digital dermatitis. **Veterinary Record**, v. 134, n. 1, p. 39, 1992.

BLOWEY, R.W.; CARTER, S.D.; WHITE, A.D.; BARNES, A. *Borrelia burgdorferi* infections in UK cattle: a possible association with digital dermatitis. **Veterinary Record** v.135, n.24, p.577-578, 1994.

BÖSE, R.; JACOBSON, R. H.; GALE, K. R.; WALTISBUHL, D. J.; WRIGHT, I. G. An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or a recombinant *B. bovis* antigen. **Parasitology Research**, v. 76, n. 8, p. 648-652, 1990.

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

BOCK, R.; JACKSON, L.; DE VOS, A. J.; JONGEJAN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v.129, p. S247-S269, 2004.

BOCK, R. E.; KINGSTON, T. G.; DE VOS, A. J. Effect of breed on innate resistance to infection with *Anaplasma marginale* transmitted by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v.77, n. 11, p. 748-51, 1999a.

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

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

BONOLDI, V. L. N.; BATTESTI, D. M.; FONSECA, A. H.; SOARES, C. O.; LEON E. P.; ZEITUNE, A. D.; YOSHINARI, N. H. Participação dos gambás (*Didelphis marsupialis*) no ciclo epidemiológico da doença de Lyme. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 36, n. 5, 276, 1996.

BOUMA, M. J; VAN DER KAAJ, H. J. El Niño Southern Oscillation and the historic malaria epidemics on the Indian subcontinent and Sri Lanka: an early warning system for future epidemics? **Tropical Medicine and International Health**, v. 1, n. 1, p. 86-96, 1996.

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

BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 7, p. 275-281, 1999.

BRUMPT, E. **Précis de Parasitologie**, Collection de Précis Médicaux Masson & C^{ie} Éditeurs, Paris; p 1452, 1927.

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

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

BURGDORFER, W.; HAYES, S. F.; CORWIN, D. Pathophysiology of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in ixodes ticks. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 51442-51449, 1989.

BURGDORFER, W. Discovery of *Borrelia burgdorferi*. In: COYLE, P. K. **Lyme Disease**. Boston: Mosby Year Book, 1993. pp 3-7,

BURGDORFER, W.; LANE, R. S.; BARBOUR, A. G.; GRESBRINK, R. A.; ANDERSON, J. R. The western black-legged tick, *Ixodes pacificus*: a vector of *Borrelia burgdorferi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, V. 34, n. 5, p. 925-930, 1985.

BURMAN, N.; BERGSTRÖM, S.; RESTREPO, B. I.; BARBOUR, A. G. The variable antigens Vmp7 and Vmp21 of the relapsing fever bacterium *Borrelia hermsii* are structurally analogous to the VSG proteins of the African trypanosome. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1715-1726, 1990.

BUSHMICH, S. L. Lyme Borreliosis in Domestic Animals. **Journal of Spirochaetal and Ticks-Borne Diseases**, v. 1, n. 1, p. 24-28, 1994.

BÜSCHER, G. The infection of various tick species with *Babesia bigemina*, its transmission and identification. **Parasitology Research**, v. 74, n. 4, p. 324-330, 1988.

CAFRUNE, M. M.; AGUIRRE, D. H. Experimental studies of the rate of infection of *Boophilus microplus* eggs with *Babesia bovis*. **Research in Veterinary Science**, v. 58, n. 3, p. 284-85, 1995.

CALLOW, L. L.; HANHAI, G. K.; VAN DER, BERGHE, E. Serological comparison of strains of *Babesia bovis* occurring in Australia and Mozambique. **Tropical Animal Health and Production**, v.13, n. 2, p. 79-82, 1981.

CALLOW, L. L. Observations on tick-transmitted spirochaetes of cattle in Australia and South Africa. **British Veterinary Journal**, v. 123, n. 11, p. 492-497, 1967.

CARRET, C.; WALAS, F.; CARCY, B.; GRANDE, N.; PRECIGOUT, E.; MOUBRI, K.; SCHETTERS, T.P.; GORENFLOT, A. *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA genes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 298-303, 1999.

CEN-AGUILAR, J. F.; RODRIGUÉZ-VOVAS, R. I.; DOMINGUEZ-ALPIZAR, J. L.; WAGNER, G. G. Studies on the effect of infection by *Babesia* sp. on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology**, v.78, n. 4, p. 253-7, 1998.

CHEN, S.; DUMLER, J. S.; BAKKER, J. S.; WALKER, D. H. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 589-595, 1994.

CHIEW, F. S. H.; PIECHOTA, T. C.; DRACUP, J. A.; MCMAHON, T. A. EL NIÑO/Southern Oscillation and Australian rainfall, streamflow and drought: Links and potential for forecasting. **Journal of Hydrology**, v. 204, p. 138-149, 1998.

CHILONDA, P.; HUYLENBROECK, G. V.; D'HAESE, L.; SAMUI, K. L.; MUSABA, E. C.; IMAKANDO, M.; AHMADU, B. Cattle production and veterinary care system in Zambia. **Outlook on Agriculture**, v. 28, p. 109-116, 1999.

CRAFT, J. E.; GRODZICKI, R. L.; STEERE, A. C. Antibody response in lyme disease: evaluation of diagnostic tests. **Journal of Infectious Diseases**, v. 149, n. 5, p. 789-795, 1984.

- CRAFT, J. E.; FISCHER, D. K.; SHIMAMOTO, G. T.; STEERE, A. C. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 78, n. 4, p. 934-939, 1986.
- COLEMAN, P. G.; PERRY B. D.; WOOLHOUSE, M. E. Endemic stability- a veterinary idea applied to human public health. **Lancet**, v. 357, n. 94, p. 1284-1286, 2001.
- CONRATHS, F. J.; SCHARES, G. Validation of molecular diagnostic techniques in the parasitological laboratory. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 2, p. 91-98, 2006.
- CORREA, W. M.; CORREA, C. N.; GOTTSCHALK, A. F. Bovine abortion associated with *Anaplasma marginale*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 42, n. 2, p. 227-228, 1978.
- COOKE, B. M.; MOHANDAS, N.; COWMAN, A. F.; COPPEL, R. L. Cellular adhesive phenomena in apicomplexan parasites of red blood cells. **Veterinary Parasitology**, v. 132, n. 3-4, p. 273-295, 2005.
- COSTA-JUNIOR, L. M.; RABELO, E. M. L.; MARTINS-FILHO, O. A.; RIBEIRO, M. F. B. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 1-3, p. 231-236, 2006
- COSSÍO-BAYÚGA, R. R.; RODRIGUEZ, S. D.; GARCIA-ORTIZ, M. A.; GARCIA-TAPIA D.; ABOYTES-TORRES, R. Bovine anaplasmosis prevalence in northern Vera cruz state, Mexico. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 32, n. 3-4, p. 165-70, 1997.
- DALGLIESH, R. J.; STEWART, N. P. Some effects of time, temperature and feeding on infection rates with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus* larvae, **International Journal for Parasitology**, v. 12, n. 4, p. 323-326, 1982.
- DE ECHAIDE, S. T.; BONO, M. F.; LUGARESI, C.; AGUIRRE, N.; MANGOLD, A.; MORETTA, R.; FARBER, M.; MONDILLO, C. Detection of antibodies against *Anaplasma marginale* in milk using a recombinant MSP5 indirect ELISA. **Veterinary Microbiology**, v. 106, n. 3-4, p. 287-292, 2005.
- DE LA FUENTE, J.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; TUMINO, G.; FURLA, R., ALMAZAN, C.; KOCAN, K. M. Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 4, p. 357-62, 2005a.
- DE LA FUENTE, J.; LEW, A.; LUTZ, H.; MELI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; MANGOLD, A.J.; ALMAZAN, C.; NARANJO, V.; GORTAZAR, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; GARCIA-PEREZ, 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.
- DE LA FUENTE, J., GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma*

marginale to bovine erythrocytes and tick cells. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 145-153, 2001a.

DE LA FUENTE, J.; VAN DER BUSSCHE, R. A.; KOCAN, K. M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichiaeae). **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 65-67, 2001b.

DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; ZIVKOVIC, Z.; NARANJO, V.; ALMAZÁN, C.; ESTEVES, E.; JONGEJAN, F.; DAFFRE, S.; MANGOLD, A. J. Functional genomics and evolution of tick-*Anaplasma* interactions and vaccine development. **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 175-186, 2010.

DE MATOS, C. A. Species composition and geographic distribution of ticks infesting cattle, goats and dogs in Maputo province, Mozambique. Dissertation M.Sc. (Veterinary Science). **Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria**, 2008. 130p. Disponível em: <<http://upetd.up.ac.za/thesis/available/etd-02202009-120124/unrestricted/dissertation.pdf>>. Acesso em: 14 Nov. 2010.

DE VOS, A. J.; POTGIETER, F. T. The effect of tick control on the epidemiology of bovine babesiosis. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p. 3-5, 1983.

DE VOS, A. J. Epidemiology and control of bovine babesiosis in South Africa. **Journal of South African Veterinary Association**, v. 50, p. 357-362, 1979.

DE WAAL, D. T.; COMBRINK, M. P. Live vaccines against bovine babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 88-96. 2006.

DIAS, J. A. T. S. Lista das carraças de Moçambique e respectivos hospedeiros. **Anais dos Serviços de Veterinária e Indústria Animal de Moçambique**, v. 3, p. 213-287, 1960.

DIAS, J. A. T. S. Some data concerning the ticks (Acarina: xodoidea) presently known in Mozambique. **Garcia de Orta, Séries Zoologica**, v. 18, n. 1, p. 27-48, 1993.

Direcção Nacional de Pecuária (DINAP). **Relatório anual de 2004**. Imprensa nacional. Ministériood Agricultura, Maputo, Moçambique, 2004.

DODGE, R. W. Culture of ethiopian *Borrelia recurrentis*. **Applied Microbiology** Washington, v. 25, n. 6, p. 935-939, 1973.

DONOGHUE, A. R.; VAN VEEN, T. W. S. Investigating cross-reactions between *Leptospira* and *Borrelia*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, n. 11, p. 1460-1462, 1989.

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

DOWSETT, K. F.; DIMMOCK, C. K.; HILL, M. W. Haemolytic disease in new born calves. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, n. 2, p. 65-7, 1978.

DRESSLER, F.; WHALEN, J. A.; REINHARDT, B. N.; STEERE, A. C. Western blotting in the serodiagnosis of lyme disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 2, p. 392-400, 1993.

DREYER, K.; FOURE, L. J.; KOK, D. J. Epidemiology of tick-borne diseases of cattle in Botshabelo and Thaba Nchu in the Free State Province. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 4, p. 285-289, 1998.

DUMLER, J. S.; ASANOVICH, K. M.; BAKKEN, J. S.; RICHTER, P.; KIMSEY, R.; MADIGAN, J. E. Serologic co-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic ehrlichia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1098-1103, 1995.

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

EISLER, M. C.; TORR, S. J.; COLEMAN, P. G.; MACHILA, N.; MORTON, J. F. Integrated control of vector-borne diseases of livestock--pyrethroids: panacea or poison?, **Trends Parasitology**, v. 19, n. 8, p. 341-345, 2003.

EGELI, A. K. Babesiosis in a six-day-old calf. **Veterinary Record**, v. 139, n. 14, p. 344-345, 1996.

ENGSTROM, S. M.; SHOOP, E.; JOHNSON, R. C. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early lyme disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 419-427, 1995.

ESTRADA-PENA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WALKER, A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 38, n. 2-3, p. 219-235, 2006.

EWING, C.; SCORPIO, A.; NELSON, D. R.; MOTHER, T. N. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from saliva of the tick vector, *Ixodes scapularis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 755-758, 1994.

FAHRIMAL, Y.; GOFF, W. L.; JASMER, D. P. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 6, p. 1373-1379, 1992.

FALCO, C. R.; FISH, D. Potential for exposure to tick bites in recreational parks in a Lyme disease endemic area. **American Journal of Public Health**, v. 79, n. 1, p. 12-15, 1989.

FALCO, C. R.; DANIELS, T. J.; FISH, D. Increase in abundance of immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in an emergent Lyme disease endemic area. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 522-526, 1995.

FELSENFELD, O. Borreliæ, human relapsing fever and parasite-vector-host relationships. **Bacteriological Reviews**, v. 11, p. 1378-1380, 1965.

FIGUEROA, J. V.; ALVAREZ, J. A.; CANTO, G. J.; RAMOS, J. A.; MOSQUEDA, J. J.; BUENING, G. M. Comparative sensitivity of two tests for the diagnosis of multiple hemoparasite infection of cattle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 23, n. 791, p. 117-1127, 1996.

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

FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 1-2, p. 69-81, 1993.

FIKRIG, E.; TELFORD, S. R. I.; BARTHOLD, S. W.; KANTOR, F. S.; SPIELMAN, A.; FLAVELL, R. A. Elimination of *Borrelia burgdorferi* from vector ticks feeding on OspA immunized mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 12, p. 5418-5421, 1992.

FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; YOSHINARI, N. H. Lyme borreliosis serology in cattle in Brazil. **Revista da Universidade Federal Rural: Ciências da Vida**, v. 18, n. 1-2, p. 85-89, 1996.

FOSGATE, G.T.; URDAZ-RODRIGUEZ, J. H.; DUNBAR, M. D.; RAE, D. O.; DONOVAN, G. A.; MELENDEZ, P.; DOBEK, G. L.; ALLEMAN, A. R. Diagnostic accuracy of methods for detecting *Anaplasma marginale* infection in lactating dairy cattle of Puerto Rico. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 192-199, 2010.

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

FRIEDHOFF, K. T. Transmission of *Babesia*. IN: RISTIC, M. **Babesiosis of domestic animals and man**. Boca Raton: C.R.C. p. 23-52, 1988.

FURLONG, J. MARTINS, J. R. S. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. Juiz de Fora: CNPGL- EMBRAPA. (Boletim Técnico 59). 2000. 25p.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais**, n. 8, p. 49-61, 1993.

- FUTSE, J. E.; UETI, M. W.; KNOWLES, D. P. JR.; PALMER, G. H. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3829-3834, 2003.
- GALE, K. R.; DIMMOCK, C. M.; GARTSIDE, M.; LEATCH, G. *Anaplasma marginale*: detection of carrier cattle by PCR-ELISA. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 1103-1109, 1996.
- GASSER, R. B. Molecular tools-advances, opportunities and prospects. **Veterinary Parasitology**, v.136, n. 2, p. 69-89, 2006.
- 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 adults by using nonradioactive in situ hybridization and microscopy, **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 911-920 1996.
- GHOSH, S.; AZHAHIANAMBI, P.; YADAV, M. P. Upcoming and future strategies of tick control: a review, **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 44, n. 2, p. 79-89, 2007.
- GILL, J. S.; MCLEAN, R. G.; SHRINER, R. B.; JOHNSON, R. C. Serologic surveillance for the lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in Minnesota by using white-tailed deer as sentinel animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 444-451, 1994.
- GILL, J. S.; JOHNSON, R. C.; SINCLAIR, M. K.; WEISBROD, A. R. Prevalence of the lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in deer tick (*Ixodes dammini*) collected from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Saint Croix State Park, Minnesota. **Journal of Wildlife Disease**, v. 29, n. 1, p. 64-72, 1993.
- GITAU, G. K.; PERRY, B. D.; KATENDE, J. M.; McDERMOTT, J. J.; MORZARIA, S. P.; YOUNG, A. S. The prevalence of serum antibodies to tick-borne infections in cattle in smallholder dairy farms in Muranga District, Kenya; a cross-sectional study. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 30, n. 2, p. 95-107, 1997.
- GLANTZ, M. H. Currents of change. In: **El Niños impact on climate and society**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 266 P.
- GRAY, J. S.; DE VOS, A. J. Studies on a bovine Babesia transmitted by *Hyalomma marginatum rufipes* Koch, 1844. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 48, p. 215-223, 19981.
- GOFF, W. L.; WAGNER, G. G.; CRAIG, T. M.; LONG, R. F. The bovine immune response to tick-derived *Babesia bovis* infection: Serologic studies of isolated immunoglobulins. **Veterinary parasitology**, v. 11, n. 2-3, p. 109-120, 1982.
- GOFF, W. L., STILLER, R. A., ROEDER, L. W.; JOHNSON, L. W.; FOLK, D.; GORHAM, JR.; MCGUIRE, T. C. Comparison of a DNA probe, complement-fixation and indirect immunofluorescence tests for diagnosing *Anaplasma marginale* in suspected carrier cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 24, n. 3-4, p. 381-390, 1990.

GOFF, W. L.; JOHNSON, W. C.; MOLLOY, J. B.; JORGENSEN, W. K.; WALDRON, S. J.; FIGUEROA, J. V.; MATTHEE, O.; ADAMS, D. S.; MCGUIRE, T. C.; PINO, I.; MOSQUEDA, J.; PALMER, G. H.; SUAREZ, C. E.; KNOWLES, D. P. MCELWAIN, T. F. Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Babesia bigemina* antibodies in cattle. **Clinical Vaccine and immunology**, v. 15, n. 9, p. 1316-1321, 2008.

GOFF, W.L. ; MOLLOY, J. B.; JOHNSON, W. C.; SUAREZ, C. E.; PINO, I.; RHALEM, A.; SAHIBI, H.; CECI, L.; CARELLI, G.; ADAMS, D. S.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P. MCELWAIN, T. F. Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Babesia bovis*. **Clinical Vaccine and immunology**, v. 13, n. 11, p. 1212-1216, 2006.

GOLIGHTLY, M. G. Antibody Assays. In: COYLE, P. K. **Lyme Disease**. Boston. Mosby Year Book, 1993. 115-120 pp

GONÇAVES-RUIZ, P. M.; PASSOS, L. M.; PATARROYO, J. H.; RIBEIRO, M. F. Antigenic characterization of morphologically distinct *Anaplasma marginale* isolates using a panel of monoclonal antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. 1-2, p. 169-177, 2002.

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

GOODGER, W. J.; CARPENTER, H. R. Estimation of economic loss associated with anaplasmosis in California beef cattle. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 174, n. 12, p. 1333-1335, 1979.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

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

GRUND, S.; NATTERMANN, H.; HORSCH, F. Electron-microscopic examination of spirochaetes in dermatitis digitales lesions in cows. **Journal of Veterinary Medicine**. V. 42, n. 9, p. 533-542, 1995.

GUGLIELMONE, A. A. The level of infestation with the vector of cattle babesiosis in Argentina. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 3, p. 133-137, 1992.

GUGLIELMONE, A. A.; GAIDO, A. B.; AGUIRRE, D. H.; CAFRUNE, M. M. Some quantitative aspects of natural babesial infection in the haemolymph of *Boophilus microplus* engorged Female ticks. **Parasite**, v. 4, n. 4, p. 337-341, 1997.

- GUGLIELMONE, A. A.; GAIDO, A. B.; MANGOLD, A. J. Light microscopy diagnosis of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* kinetes in the haemolymph of artificially infected *Boophilus microplus* engorged females ticks. **Veterinary Parasitology**, v. 61, n. 1-2, p. 15-20, 1996a.
- GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America, **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 109-119, 1995.
- GUSTAFSON, J. M.; BURGESS, E. C.; WACHAL, M. D.; STEINBERG, H. Intrauterine transmission of *Borrelia burgdorferi* in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 6, p. 882-890, 1993.
- HADANI, A.; GUGLIELMONE, A. A.; BERMÚDEZ, A. C. Detección de espiroquetas del género *Borrelia* en bovinos de la provincia de Salta, Argentina. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 66, n. 5, p. 292-294, 1985.
- HART, L. T.; MORRIS, N. G.; BESSIN, R.; LEPRINCE, D. J.; TODD, W. J.; ENRIGHT, F. M.; LUTHER, D. G. Single step technique for staining *Anaplasma marginale* in bovine blood smears. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 10, p. 1732-3, 1992.
- HARVEY, J. W.; SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M. Cyclic thrombocytopenia induced by a rickettsial-like agent in dogs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 137, n. 2, p. 182-188, 1978.
- HAWKINS, J. A.; LOVE, J. N.; HIDALGO, R. J. Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: Tabanidae). **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 732-734, 1982.
- HESTERBERG, U.; BAGNALL, R.; PERRETT, K.; GUMMOW, B. A questionnaire survey of perceptions and preventive measures related to animal health amongst cattle owners of rural communities in KwaZulu-Natal, South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 78, n. 4, p. 205-208, 2007.
- HOMER, M. J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELEFORD III, S. R.; KRAUSE, P. J.; PERSING, D. H. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 3, p. 451-469, 2000.
- HOOGSTRAAL, H. Ticks and spirochetes. **Acta Tropica**, v. 36, p. 133-136, 1979.
- HOOGSTRAAL, H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advances in Parasitology**, v. 24, p. 135-238, 1985.
- HUNGERFORD, L. L., SMITH, R. D. Variations in seroprevalence and host factors for bovine anaplasmosis in Illinois. **Veterinary Research Community**, v. 21, n. 1, p. 9-18, 1997.
- HYDE, F. W.; JOHNSON, R. C.; WHITE, T. J.; SHELBURNE, C. E. Detectin of antigens in urine of mice and humans infected with *Borrelia burgdorferi*, etiologic agent of lyme disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 58-61, 1989.

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

INAM (Instituto Nacional de Meteorologia de Moçambique). Disponível em: <www.inam.gov.mz>. Acessado em: 15 Mar 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA - INE. Evolução dos Efectivos Pecuários nas pequenas e médias explorações (2002-2006). Moçambique, 2006. Disponível em: <http://www.ine.gov.mz/sectorias_dir/Agricultura/agr_eppme>. Acesso em: Mar 2010.

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

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

JAENSON, T. G. T.; TALLEKLINT, L. Lyme borreliosis spirochetes in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) and the varying hare on isolated islands in the Baltic Sea. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 3, p. 339-343, 1996.

JOBE, D. A.; CALLISTER, S. M.; SCHELL, R. F. Recovery of *Borrelia burgdorferi* by filtration. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1896-1898, 1993.

JOHNSON, R. C.; BURGDORFER, W.; LANE, R. S.; BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F.; HYDE, F. W. *Borrelia coriaceae* sp. nov. putative agent of epizootic bovine abortion. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 72-74, 1987.

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. 1-2, p.1-9, 2008.

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. 4, p. 297-305, 2000.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks, **Parasitology**, v. 129, p. S3-S14, 2004.

JONGEJAN, F.; PERRY, B. D.; MOORHOUSE, P. D.; MUSISI, F. L.; PEGRAM, R. G. SNACKEN, M. Epidemiology of bovine babesiosis and anaplasmosis in Zambia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 20, n. 4, p. 234-242, 1988.

JORGENSEN, W. K., WELIGAMA, G. J., NAVARATNE, M.; DAGLIESH, R. J. Prevalence of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* at selected localities in Sri Lanka. **Tropical Animal Health and Production**, v. 24, n. 1, p. 9-14, 1992.

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

KIMURA, K.; ISOGAI, E.; ISOGAI, H.; KAMEWAKA, Y.; NISHIKAWA, T.; ISHII N.; FUJII, N. Detection of Lyme disease spirochetes in skin of naturally infected wild sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1641-1642, 1995.

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

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

KNOWLES, R. T.; MONTROSE, M.; CRAIG, T. M.; WAGNER, G. G.; LONG, R. F. Clinical and serological evidence of bovine babesiosis and anaplasmosis in St. Lucia. **Veterinary Parasitology**, v. 10, n. 4, p. 307-311, 1982.

KNOWLES, D.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; PALMER, G.; MCGUIRE, T.; STILLER, D.; McELWAIN, T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MPS5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, 1996.

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

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

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, p. S285-S300, 2004.

KOCAN, K. M.; YOSHIOKA, J.; SONENSHINE, D. E.; DE LA FUENTE, J.; CERAUL, S.M.; BLOUIN, E. F.; ALMAZAN, C. Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale*

(Rickettsiales: Anaplasmataceae). **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 5, p. 864-74, 2005.

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

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

KOVATS, R. S.; BOUMA, M. J.; HAJAT, S.; WORRALL, E.; HAINES, A. El Niño and health. **Lancet**, v. 362, p. 1481-1489, 2003.

KOVATS, R. S. El Niño and human health. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, n. 9, p. 1127-1135, 2000.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Sitematic Bacteriology**. v. 1, 8th Edition, Williams; Wilkins, London. 1984. p. 57-62,

KUNZ, S. E.; KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: resistance and enviromental impact. **Revue Scientifique et Technique**, v. 13, n. 4, p. 1249-1286, 1994

KURTENBACH, K.; KAMPEN, H.; DIZIJ, A.; ARNDT, S.; SEITZ, H.M.; SCHAIBLE, U.E.; SIMON, M. Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s.l. in German wood lands. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 6, p. 807-817, 1995.

KUIPER, H.; VAN DAM, A. P.; SPANJAARD, L.; JONGH, B. M.; WIDJOJOKUSUMO, A.; RAMSELAAR, T. C. P.; CAIRO, I.; VOS, K.; DANKERT, J. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from biopsy specimens taken from healthy-looking skin of patients with lyme borreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 715-720, 1994.

KUTTLER, K. L. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: A review. **Journal Wildlife Disease**, v. 20, n. 1, p. 12-20, 1984.

KUTTLER, K. L.; CLIFFORD, D. J.; AND TOURAY, B. N. Prevalence of anaplasmosis and babesiosis in N'Dama cattle of The Gambia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 20, n. 1, p. 37-41, 1988.

KUTTLER, K.L. The effect of Imidocarb treatment on *Babesia* in the bovine and the tick (*Boophilus microplus*), **Research in Veterinary Science**, v. 18, n. 2, p. 198-200, 1975.

LANE, R. S.; BROWN, R. N.; PIESMAN, J.; PEAVEY, C. Vector competence of *Ixodes pacificus* and *Dermacentor occidentalis* (Acari: Ixodidae) for various isolates of Lyme disease spirochetes. **Journal of Medical Entomology**, v. 31, n. 3, p. 417-424, 1994.

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

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

LEBECH, A. M.; HANSEN, K. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late lyme neuroborreliosis by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1646-1653, 1992.

LEBECH, A. M.; CLEMMENSEN, O.; HANSEN, K. Comparison of *in vitro* culture, immunohistochemical staining, and PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in tissue from experimentally infected animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2328-2333, 1995.

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

LEVINE, N. D. Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. **Journal of Protozoology**, v. 35, n. 4, p. 518-20, 1988.

LESSARD, P.; L'EPLATTENIER, R.; NORVAL, R. A. I.; KUNDERT, K.; DOLAN, T. T.; CROZE, H.; WALKER, J. B.; IRVIN, A. D.; PERRY, B. D. Geographical information systems for studying the epidemiology of cattle diseases caused by *Theileria parva*. **Veterinary Record**, v. 126, n. 11, p. 255-262, 1990.

LINDBLADE, K. A.; WALKER, E. D.; ONAPA, A. W.; KATUNGU, J; WILSON, M. L. Highland malaria in Uganda: prospective analysis of an epidemic associated with El Niño. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 480-487, 1999.

LIENBLING, M. R.; NISHIO, M. J.; RODRIGUEZ, A.; SIGAL, L. H.; JIN, T.; LOUIE, J. S. The polymerase chain reaction for the detection of *Borrelia burgdorferi* in human body fluids. **Arthritis and Rheumatism**, v. 36, n. 5, p. 665-675, 1993.

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

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

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R.; VALADÃO, I. 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.

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

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

McDONALD, D. The analysis of malaria parasite rates in infants. **Tropical Diseases Bulletin**, v. 47, n. 10, p. 915-937, 1950.

MACKENSTEDT, U.; GAUER, M.; FUCHS, P.; ZAPF, F.; SCHEIN, E.; MEHLHORN, H. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. **Parasitology Research**, v. 81, n. 7, p. 595-604, 1995a.

MAGNARELLI, L. A.; STAFFORD, K. C.; MATHER, T. N.; YEH, M. T.; HORN, K. D.; DUMLER, J. S. Hemocytic *rickettsia*-like organisms in ticks: serologic reactivity with antisera to *Ehrlichia* and detection of DNA of agent of human granulocytic ehrlichiosis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 10, p. 2710-2714, 1995b.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; JOHNSON, R. C. Analyses of mammalian sera in enzyme-linked immunosorbent assays with different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 2, p. 159-165, 1995c.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; JOHNSON, R. C.; NADELMAN, R. B.; WORMSER, G. P. Comparison of different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato used as antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 1154-1158, 1994a.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; STAFFORD, K. C. Detection of *Borrelia burgdorferi* in urine of *Peromyscus leucopus* by inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 777-782, 1994b.

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

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

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; APPERSON, C. S.; FISH, D.; JOHNSON, R. C.; CHAPPELL, W. A. Spirochetes in ticks and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in white tailed deer from Connecticut, New York state, and North Carolina. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 22, n. 2, p. 178-188, 1986.

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

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

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of class-specific immunoglobulin to *Borrelia burgdorferi*. **American Journal of Epidemiology**, v. 127, n. 4, p. 818-825, 1988.

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. 3-4, p. 273-280, 2008.

MAHONEY, D.F.; MIRRE, G.B. Bovine babesiosis: estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 65, n. 3, p. 309-17, 1971.

MAHONEY, D.H.; WRIGHT, I.G.; GODGER, B.V.; MIRRE, G.B; SUTHERST, R.W.; UTECH, K.B. The transmission of *Babesia bovis* in herds of European and Zebu x European cattle infested with the tick *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, n. 10, p. 461-9, 1981

MAHONEY, D. F.; MIRRE, G. B. A note on the transmission of *Babesia bovis* (syn *B. argentina*) by the one-host tick, *Boophilus microplus*, **Research in Veterinary Science**, v. 26, n. 2, p. 253-254, 1979.

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

MAHONEY, D. F.; MIRRE, G. B. The selection of larvae of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). **Research in Veterinary Science**, v. 23, n. 1, p. 126-127, 1977.

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

MAHONEY, D. F. The diagnosis of babesiosis in Australia, In: Wells E.A. (Ed.), **Workshop on Hemoparasites (Anaplasmosis and Babesiosis)**. CIAT, Cali, Colombia. 1975. p. 49-62.

MARCONI, R. T.; LIVERIS, D.; SCHWARTZ, I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 2427-2434, 1995.

MARTINS T. M.; PEDRO, O. C.; CALDEIRA, R. A.; DO ROSÁRIO, V. E.; NEVES, L.; DOMINGOS, A. Detection of bovine babesiosis in Mozambique by a novel seminested hot-start PCR method. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 3-4, p. 225-230, 2008.

MARTINS T. M.; NEVES, L.; PEDRO O. C.; FAFETINE, J. M.; DO ROSÁRIO, V. E., DOMINGOS, A. Molecular detection of *Babesia* spp. and other haemoparasitic infections of cattle in Maputo Province, Mozambique, **Parasitology**, v. 137, n. 6, p. 939-946, 2010.

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

MANWEILER, S. A.; LANE, R. S.; BLOCK, W. M.; MORRISON, M. L. Survey of birds and lizards for ixodid ticks (Acari: Ixodidae) and spirochetal infection in northern California. **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 6, p. 1011-1015, 1990.

MASON, S. J.; GODDARD, L. Probabilistic precipitation anomalies associated with ENSO. **Bulletin of the American Meteorological Society**, v. 82, n. 4, p. 619-638, 2001.

MASUZAWA, T.; BEPPU, Y.; KAWABATA, H.; YANAGIHARA, Y.; IWAMOTO Y.; SHIMIZU, T.; JOHNSON, R. C. Experimental *Borrelia burgdorferi* infection of outbred mice. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 11, p. 3016-3018, 1992.

MASUZAWA, T.; SUZUKI, H.; KAWABATA, H.; ISHIGURO, F.; TAKADA, N.; YANO, Y.; YANAGIHARA, I. Identification of spirochete isolated from wild rodents in Japan as *Borrelia japonica*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1392-1394, 1995.

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

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

MATTIOLI, R. C.; BAH, M.; FAYE, J. A.; KORA, S.; CASSAMA, M. A comparison of field tick infestation on N'Dama, Gobra zebu and N'Dama x Gobra zebu cattle. **Parasitology**, v. 47, p. 139-148, 1993.

MATTIOLI, R. C.; JANNEH, L.; CORR, N.; FAYE, J. A.; PANDEY, V. S.; VERHULST, A. Seasonal prevalence of ticks and tick transmitted haemoparasites in traditionally managed

N'Dama cattle with reference to strategic tick control in The Gambia. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, n. 4, p. 342-348, 1997

MATUSCHKA, F. R.; SPIELMAN, A. Loss of Lyme disease spirochetes from *Ixodes ricinus* ticks feeding on European blackbirds. **Experimental Parasitology**, v. 74, n. 2, p. 151-158, 1992.

MAUPIN, G. O.; GAGE, K. L.; PIESMAN, J.; MONTENIERI, J.; SVIAT, S. L.; ZANDEN, L. V.; HAPP, C. M.; DOLAN, M.; JOHNSON, B. J. B. Discovery of an enzootic cycle of *Borrelia burgdorferi* in *Neotoma mexicana* and *Ixodes spinipalpis* from Northern Colorado, an area where Lyme disease is non endemic. **Journal of Infectious Disease**, v. 170, p. 636-643, 1994.

MBATI, P. A.; HLATSHWAYO, M.; MTSHALI, M. S.; MOGASWANE, K. R.; WAAL, T. D.; DIPEOLU, O. O. Ticks and tick-borne diseases of livestock belonging to resource-poor farmers in eastern Free State of South Africa. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 28, n. 1-4, p. 217-224, 2002.

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

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

McHARDY, N.; SIMPSON, R. M. Imidocarb dipropionate therapy in Kenyan anaplasmosis and babesiosis. **Tropical Animal Health and Production**, v. 6, n. 2, p. 63-70, 1974.

McMICHAEL, A. J.; KOVATS, R. S. Strategies for assessing health impacts of global environmental change. In: Implementing ecological integrity. **Restoring regional and global environmental and human health**, Crabbé, P. Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000. P. 217-231.

McMICHAEL, A. J. The urban environment and health in a world of increasing globalization: issues for developing countries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, n. 9, 1117-1126, 2000.

McLEAN, R. G.; UBICO, S. R. COOKSEY, L. M. Experimental infection of the eastern chipmunk (*Tamias striatus*) with the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 29, n. 4, p. 527-532, 1993a.

McLEAN, R. G.; UBICO, S. R.; NORTONHUGHES, C. A.; ENGSTROM, S. M.; JOHNSON, R. C. Isolation and characterization of *Borrelia burgdorferi* from blood of a bird captured in the Saint Croix River Valley. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2038-2043, 1993b.

MENDES, M. C.; PINTO LIMA, C. K.; PEREIRA, J. R. Práticas de Manejo para o Controle do Carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) em Propriedades localizadas na Região de Pindamonhangaba, Vale do Paraíba, São Paulo. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 75, n. 3, p. 371-373, 2008.

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

MELHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, London, v. 23, p. 37-99, 1984.

MEHLITZ, D.; EHRET, R. Serological investigations on the prevalence of piroplasmosis and anaplasmosis in cattle in Botswana. **Zentralblatt Tropenmed Parasitokund**, v. 25, n. 1, p. 3-10, 1974.

MEREDITH, S. E. O.; KROON, N. C. M.; SONDRUP, E.; SEAMAN, J.; GORIS, M. G. A.; VAN INGEN, C. W.; OOSTING, H.; SCHOONE, G. J.; TERPSTRA, W. J.; OSKAM, L. *Leish*-kit, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, p. 1742-1745, 1995.

MELTZER, M.I. A possible explanation of the apparent breed related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations. **Veterinary Parasitology**, v. 67, p. 275-279, 1996.

MILLER, D. K.; DIAL, O.; CRAIG, T. M.; WAGNER, G. G. Serological prevalence of bovine babesiosis in Mali. **Tropical Animal Health and Production**, v. 16, n. 2, p. 71-77, 1984.

MITCHELL, P. D.; REED, K. D.; ASPESLET, T. L.; VANDERMAUSE, M. F.; MELSKI, J. W. Comparison of four immunoserologic assays for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in patients with culture-positive erythema migrans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1958-1962, 1994.

MIYAMOTO, K.; NAKAO, M.; UCHIKAWA, K.; FUJITA, H. Prevalence of lyme borreliosis spirochetes in ixodid ticks of japan, with special reference to a new potential vector, *Ixodes ovatus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 29, n. 2, p. 216-220, 1992.

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

MOLLOY, J. B., BOWLES, P. M., KNOWLES, D. P. McELWAIN, T. F.; BOCK, R. E.; KINGSTON, T. G.; BLIGHT, G. W.; DAGLIESH, R. J. Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 4, p. 245-249, 1999.

MONTENEGRO-JAMES, S.; GUILLEN, A.T.; MA, S.J.; TAPANG, P.; ABDEL-GAWAD, A.; TORO, M.; RISTIC, M. Use of the dot enzyme-linked immunosorbent assay with isolated

Anaplasma marginale initial bodies for serodiagnosis of anaplasmosis in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.51, n.10, p.1518-1521, 1990.

MONTENEGRO-JAMES, S.; JAMES, M. A.; RISTIC, M. Modified indirect fluorescent antibodytest for the serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infections in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 11, p. 2401-2403, 1985.

MORRIS, R. S. The application of economics in animal health Programmers': A practical guide. **Revue Scientifique et technique**, v. 18, n. 2, p. 305-314, 1999.

MOSQUEDA, J.; FALCON, A.; ALVAREZ, J. A.; RAMOS, J.; OROPEZA-HERNANDEZ, L. F.; FIGUEROA, J. V. *Babesia bigemina* sexual stages are induced in vitro and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 11, p. 1229-36, 2004.

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

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

MOURITSEN, C. L.; WITWER, C. T.; LITWIN, C. M.; YANG, L.; WEIS, J. J.; MARTINS, T. B.; JASKOWSKI, T. D.; HILL, H. R. Polymerase chain reaction of lyme disease. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 105, n. 5, p. 647-654, 1996.

MORZARIA, S.; KATENDE, J.; KAIRO, A.; NENE, V.; MUSOKE, A. New methods for the diagnosis of *Babesia bigemina* infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 201-205, 1992. Suppl. 3.

MTSHALI, M. S.; DE WAAL, D. T.; MBATI, P. A. A sero-epidemiological survey of blood parasites in cattle in the north-eastern Free State, South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 1, p. 67-75, 2004.

MTSHALI, M. S.; DE LA FUENTE, J.; RUYBAL, P.; KOCAN, K. M.; VICENTE, J.; MBATI, P. A.; SHAP, V.; BLOQUIN, E. F.; MOHALE, N. E.; MOLOI, T. P.; SPICKETT, A. M.; LATIF, A. A. Prevalence and genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains in cattle in South Africa. **Zoonoses Public Health**, v. 54, n. 1, p. 23-30, 2007.

MUGISHA, A.; MCLEOD, A.; PERCY, R.; KYEWALABYE, E. Socio-economic factors influencing control of vector-borne diseases in the pastoralist system of south western Uganda. **Tropical Animal Health and Production**, v. 40, n. 4, p. 287-297, 2008.

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

- NAKAMURA, Y.; SHIMIZU, S.; NINAMI, T.; ITO, S. Enzyme-linked immunosorbent assay using solubilized antigen for detection of antibody to *Anaplasma marginale*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 20, n. 4, p. 259-266, 1988.
- NAKAO, M.; MIYAMOTO, K.; UCHIKAWA, K.; FUJITA, H. Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus* ticks in Japan. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, n. 4, p. 505-511, 1992.
- NAKAO, M.; MIYAMOTO, K.; FUKUNAGA, M. Lyme disease spirochetes in Japan: enzootic transmission cycles in birds, rodents, and *Ixodes persulcatus* ticks. **Journal of Infectious Disease**, v. 170, n. 4, p. 878-882, 1994.
- NDOU, R. V.; DIPHAHE, T. P.; DZOMA, B. M.; MOTSEI, L. E. The seroprevalence and endemic stability of anaplasmosis in cattle around Mafkeng in the North West Province, South Africa. **Veterinary Research**, v. 3, n. 1, p. 1-3, p.2010.
- NEITZ, W. O. A consolidation of our knowledge of the transmission of tick-borne disease. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 27, p. 115-163, 1956.
- NEITZ, W. O. The transmission of *Spirochaeta theileri* to a Blesbuck (*Damaliscus albifrons*). **Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry**, v. 5, n. 1, p. 7, 1935.
- NEITZ, W. O.; THOMAS, A.D. Rickettsiosis in dogs. **Journal of the South African Veterinary Medicine Association**, v. 9, n. 4, p. 166-174, 1938.
- NEVES, L.; SANTANA FONSO.; HORAK, I. G. Ixodid ticks on dogs in and around Maputo and elsewhere in Mozambique. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 279-283, 2004.
- NICHOLLS, T. H.; CALLISTER, S. M. Lyme disease spirochetes in ticks collected from birds in midwestern United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 3, p. 379-383, 1996.
- NIELSEN, K.; SMITH, P.; GALL, D.; DE ECHAIDE, S. T.; WAGNER, G.; DAJER, A. Development and validation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera. **Veterinary Parasitology**, v. 67, n. 3-4, p. 133-142, 1996.
- NOLAN, I. Acaricide resistance in single and multi-host ticks and strategies for control. **Parasitologia**, v. 32, n. 1, p. 145-153, 1990.
- NORTON, J. H.; PARKER, R. J.; FORBES-FAULKNER, J. C. Neonatal anaplasmosis in a calf. **Veterinary Record**, v. 100, n. 3, p. 58, 1983.
- NORVAL, R. A. I.; SUTHERST, R. W.; KURKI, J.; GIBSON, J. D.; KERR, J. D. The effect of the brown ear-tick *Rhipicephalus appendiculatus* on the growth of Sanga and European breed cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 30, n. 2, p. 149-164, 1988.
- NORVAL, R. A. I. The effects of partial beak down of dipping in African areas in Rhodesia. **Rhodesia Veterinary Journal**, v. 9, p. 6-9, 1978.

NORVAL, R. A. I.; FIVAZ, B. H.; LAWURENCE, J. A.; DAILLE-COURT, T. Epidemiology of tick-borne diseases of cattle in Zimbabwe. I. Babesiosis. **Tropical Animal Health and Production**, v. 16, p. 63-70, 1983.

OBERLE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; MCGUIRE, T. C. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 6, p. 1567-1573, 1988.

OKUTHE, O. S.; BUYU, G. E. Prevalence and incidence of tick-borne diseases in smallholder farming systems in the Western-Kenia highlands. **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 307-312, 2006.

OKSI, J.; UKSILA, J.; MARJAMAKI, M.; NIKOSKELAINEN, J.; VILJANEN, M. K. Antibodies against whole sonicated *Borrelia burgdorferi* spirochetes, 41-kilodalton flagellin, and P39 protein in patients with PCR or cultures-proven late Lyme borreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2260-2264, 1995.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; OLIVEIRA, M. C. S.; ARAÚJO Jr, J. P.; AMARANTE, A. F. T. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 1, p. 105-111, 2005.

OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; ARAÚJO Jr., J. P.; AMARANTE, A. F. T.; OLIVEIRA, H. N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 1-2, p.61-7, 2005.

OLIVEIRA, A.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; YOSHINARI, N. H. Cinética do crescimento de *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetaceae) em diferentes meios de cultivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 61-64, 2004.

OLIVER JR, J. H.; OWSLER, M. R.; HUTCHENSON, H. J.; JAMES, A. M.; CHEN, C.; IRBY, W. S.; DOTSON, E. M.; MCLAIN, D. K. Conspecificity of the ticks *Ixodes scapularis* and *I. dammini* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 54-63, 1993.

OSEBOLD, J. W.; SPEZIALETTI, R.; JENNINGS, M. B.; PRITCHETT, R. F.; BUSHNELL, R. B. Congenital spirochetosis in calves: association with epizootic bovine abortion. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, n. 4, p. 371-375, 1986.

OLSEN, B.; DUFFY, D. C.; JAENSON, T. G. T.; GYLFE, A.; BONNEDAHL, J.; BERGSTROM, S. Trans hemispheric exchange of Lyme disease spirochetes by seabirds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3270-3274, 1995.

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.

- PACHNER, A. R.; BASTA, J.; DELANEY, E.; HULINSKA, D. Localization of *Borrelia burgdorferi* in murine Lyme borreliosis by electron microscopy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 2, p. 128-133, 1995.
- PAINE, G. D.; MILLER, A.S. Anaplasmosis in a newborn calf. **Veterinary Record**, v. 15 n. 3. p. 58, 1977.
- PANDEY, N. N.; MISHRA, S. S. Studies on clinical symptoms and percentage parasitaemia on experimental *Babesia bigemina* infection in cow calves. **Indian Veterinary Journal**, v. 55, p. 139-143, 1978.
- PALMER, G. H.; BROWN, W. C.; RURANGIRWA, F. R. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 2, p. 167-76, 2000.
- PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; KUTTLER, K. L.; McGUIRE, T. C. Detection of an *Anaplasma marginale* common surface protein present in all stages of infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 1078-1083, 1986.
- 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. 7, p. 281-286, 1999.
- PARKER, R. J.; SHEPHERD, R. K.; TRUEMAN, K. F.; JONES, G. W.; KENT, A. S.; POLKINGHORNE, I. G. Susceptibility of *Bos indicus* and *Bos taurus* to *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections. **Veterinary Parasitology**, v. 17, n. 3, p. 205-13, 1985.
- PARKER, J. L.; WHITE, K. W. Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. **Cornell Veterinarian**, v. 82, p. 253-274, 1992.
- PAVLOVSKY, E. N. **Natural Nidality of Transmissible Disease**. Peace Publishers, 1965. 250pp.
- PEGRAM, R. G.; BANDA, D. S. Ecology and phenology of cattle ticks in Zambia: development and survival of free-living stages. **Experimental and Applied Acarology**, v. 8, n. 4, p. 291-301, 1990.
- PEGRAM, R. G.; WILSON, D. D.; HANSEN, J. W. Past and present national tick control programs. Why they succeed or fail. **Annual New York Academic Science**, v. 916, p. 546-554, 2000.
- PERSING, D. H.; MATHIESEN, D.; MARSHALL, W. F.; TELFORD, S. R.; SPIELMAN, A.; THOMFORD, J. W.; CONRAD, P. A. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 8, p. 2097-2103, 1992.
- PETERS, I. R.; HELPS, C. R.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Real time RT-PCR: Considerations for efficient and sensitive assay design. **Journal of Immunological Methods**, v. 286, p. 203-217, 2004.

PIESMAN, J.; MATHER, T. N.; TELFORD, S. R.; SPIELMAN, A. Concurrent *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* infection in nymphal *Ixodes dammini*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 446-447, 1986.

PIESMAN, J.; MATHER, T. N.; SINSKY, R. J.; SPIELMAN, A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 8, p.557-558, 1987.

PIESMAN, J.; OLIVER, J. R.; SINSKY, R. J. Growth kinetics of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in the vector tick (*Ixodes dammini*). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 352-357, 1990.

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

POST, J. E. Lyme disease in large animals. **New Jersey Medicine**, Lawrenceville, v. 87, n. 7, p. 575-577, 1990.

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

POTGIETER, F.T.; ELS, H. J. Light electron microscopic observations on the development of small merozoítas of *Babesia bovis* in *Boophilus microplus* larvae. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 3, p. 123-128, 1976.

POTGIETER, F. T.; Els, H. J. Light and electron microscopic observations on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymphae and non-replete females of *Boophilus decoloratus*, **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 44, p. 213-231, 1977.

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

POTGIETER, F. T.; VAN RENSBURG, L. The persistence of colostral *Anaplasma marginale* antibodies and incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 4, p. 557-560, 1987.

POTGIETER, F. T. Epizootiology and control of anaplasmosis in South Africa. **Journal of South African Veterinary Association**, v. 50, n. 4, p. 367-372, 1979.

QUINTÃO-SILVA, M. G.; RIBEIRO, M. F. B. Infection rate of *Babesia* spp. sporokinets in engorged *Boophilus microplus* from an area of enzootic stability in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memoria de Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 999-1002, 2003.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. 1st edition. Ed. Wolf Publishing, 1994. 292-303 pp.

- RAHN, D. W.; MALAWISTA, S. E. Lyme Disease: recommendations for diagnosis and treatment. **Annals of Internal Medicine**, v. 114, n. 6, p. 472-481, 1991.
- RAJPUT, Z. I.; HU, S.; CHEN, W.; ARIJO, A. G.; XIAO, C. Review: Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 7, n. 11, p. 912-921, 2006.
- RANDOLPH, S. E.; CRAINE, N. G. General frame work for comparative quantitative studies on tranmission of tick-borne disease using Lyme borreliosis in Europa as an example. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 6, p. 765-777, 1995.
- RANDOLPH, S. E. Climate, satellite imagery and the seasonal abundance of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* in southern Africa: a new perspective. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 7, n. 3, p. 243-258, 1993.
- RANDOLPH, S. E. Abiotic and biotic determinants of the seasonal dynamics of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* in South Africa. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, n. 1, p. 25-37, 1997.
- RANDOLPH, S. E.; GERN, L.; NUTTALL P. A. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. **Parasitology Today**, v. 12, n. 12, p. 472-479, 1996.
- RESTREPO, B. I.; CARTER, J.; BARBOUR, A. G. Activation of a vmp pseudogenein *Borrelia hermsii*: an alternate mechanism of antigenic variation during relapsing fever. **Molecular Microbiology**, v. 3, n. 2, v. 287-299, 1994.
- RIBEIRO, J. M. C.; MATHER, T. N.; PIESMAN, J.; SPIELMAN, A. Dissemination and salivary delivery of Lyme Disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 24, n. 2, p. 201-205, 1987.
- RICH, S. M.; AMSTRONG, P. M.; SMITH, R. D.; TELFORD III, S. R. Lone star tick-infecting borreliae are most closely related to the agent of bovine borreliosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 494-497, 2001.
- RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2107-2112, 1994.
- RIEK, R. F. The cycle of *Babesia argentina* (Lignières, 1903) (Sporozoa : Piroplasmidea) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 17, p. 247-254, 1966.
- RIEK, R. F. The cycle of *Babesia bigemina* (Smith & kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 15, p. 802-821, 1964.

RECEVES, J. D.; SWIFT, B. L. Iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician**, v. 13, n. 5, p. 911-914, 1977.

REYNA-BELLO, A.; CLOECKAERT, A.; VIZCAINO, N.; GONZATTI, M. I.; ASO, P. M.; DUBRAY, G.; ZYGMUNT, M. S. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 2, p. 259-62, 1998.

RISTIC, M. Anaplasmosis. In: WEINMAN, D. RISTIC, M. **Infectious blood diseases of man and animals**. New York: Academic Press, 1968. p. 473-536.

RISTIC, M. A capillary tube agglutination test for anaplasmosis: a preliminary report. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 141, p. 588-594, 1962.

ROCHA, C. M. B. M.; OLIVEIRA, P. R.; LEITE, R. C. Percepção dos produtores de leite do Município de Passos, MG, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), 2001. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1235- 1242, 2006.

RODGERS, S. J.; SALIKI, J. T.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. The development of a semi-automated latex agglutination test for the detection of antibodies to *Anaplasma marginale* using a cell culture-derived antigen. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 849, p. 282-292, 1998.

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

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

ROSS, J. P.; LOHR, K. F. Transmission and persistence of colostral antibodies to *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Zeitschrift fur Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 21, p. 401-411, 1970.

ROSS, J. P. J.; LOHR, K. F. Serological diagnosis of *Babesia bigemina* infection in cattle by the indirect fluorescent antibody test. **Research in Veterinary Science**, v. 9, n. 6, p. 557-562, 1968.

ROTHWELL, J. T.; CHRISTIE, B. M.; WILLIAMS, C.; WALKER, K. H. Suspected Lyme disease in a cow. **Australian Veterinary Journal**, v. 66, n. 9, p. 296-298, 1989.

RUSSELL, H.; SAMPSON, J. S.; SCHIMID, G. P.; WILKINSON, H. W.; PLIKAYTIS, B.. Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for lyme disease. **Journal of Infectious Disease**, v. 149, n. 3, p. 465-470, 1984.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: **A Laboratory Manual**, vol. I. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada á experimentação animal**. 2^a ed. Belo Horizonte: Editora FEPMVZ, 2002, 265p.

SANTOS, T. R. B.; GONZALES, J. C.; CHIES, J. M.; FARIAS, N. A. R. Transmissão transovariana de *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) por partenóginas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, n. 1, p. 7-10, 1998.

SCHWAN, T. G. Ticks and *Borrelia*: model systems for investigating pathogen-arthropod interactions. **Infectious agents and disease**, v. 5, n. 3, p. 167-181, 1996.

SCOLES, G. A.; BROCE, A. B.; LYSK, 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, 2005.

SCHOOLS, L. M.; VAN DE POL, L.; RIJPKEMA, S. G.; SCHOT, C. S. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2215-2222, 1999.

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

SCHOELER, G. B.; LANE, R. S. Efficiency of transovarial transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in the western black legged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 80-86, 1993.

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

SHILLHORN VAN VEEN, T. W.; LEYENDEKKERS, G. J. *Borrelia theileri* (Laveran, 1903) in cattle in the Netherlands. **Tijdschrift Voor Diergeneeskunde**, v. 96, p. 1028-1031, 1971.

SHIH, C. M.; TELFORD, S. R.; SPIELMAN, A. Effect of ambient temperature on competence of deer ticks as hosts for Lyme disease spirochetes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 958-961, 1995.

SHIMADA, M. K.; YAMAMURA, M. H.; KAWASAKI, P. M.; TAMEKUNI, K.; IGARASHI, M. VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in larvae of *Boophilus microplus* ticks by polymerase chain reaction. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1026, p. 95-102, 2004.

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

SMITH, R. D.; MIRANPURI, G. S.; ADAMS, J. H.; AHRENS, E. H. *Borrelia theileri*: Isolation from ticks (*Boophilus microplus*) and tick-borne transmission between

- splenectomized calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 6, p. 1396-1398, 1985.
- SMITH, R. D.; ROGERS, A. B. *Borrelia theileri*: A review. **Journal of Spirochetal and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 4, p. 63-68, 1998.
- SMITH, T.; KILBORNE, F. L. Investigation of nature, causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. **Bulletin Bureau of Animal Industry of United States**. Department of Agriculture, v. 1, p. 1, 1893.
- SILVA, A. M.; FIKRIG, E. *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in ticks and mammals. **Parasitology Today**, v. 13, n. 7, p. 267-270, 1997.
- SIMLER, K. R.; NHATE, V. Poverty, Inequality, and Geographic Targeting: Evidence from Small-Area Estimates in Mozambique, **International Food Research Institute**, Food Consumption and Nutrition Division (FCND Discussion Paper 192), 2005.
- SIMUUNZA, M.; WEIR, W.; COURCIER, E.; TAIT, A.; SHIELS, B. Epidemiological analysis of tick-borne diseases in Zambia. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3-4, p. 331-342, 2011.
- SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 10, p. 1135-1145, 1997.
- SOARES, C. O. Princípios, padronização e validações de provas sorológicas. IN: MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O.; **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. EMBRAPA GADO DE CORTE, Campo Grande. 2001. 145-176. PP.
- SONENSHINE D. E. **Biology of Ticks**. Vol. 2. New York. Oxford University Press. 1991. 464p.
- SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks. Volume II**. New York. Oxford University Press,. 1993.
- SONENSHINE, D. E.; MATHER, T. N. **Ecological Dynamics of Tick-Borne Zoonoses**. New York. Oxford University Press. 1994. 464 p.
- SPIELMAN, A.; CLIFFORD, C. M.; PIESMAN, J.; CORWIN, M. D. Human babesiosis on Nantucket Island, USA: description of the vector, *Ixodes dammini*, N. Sp. (Acarina: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 15, n. 3, p. 218-234. 1979.
- SPIELMAN, A.; WILSON, M. L.; LEVINE, J. F.; PIESMAN, J. Ecology of *Ixodes dammini* borne human babesiosis and Lyme disease. **Annual Review of Entomology**, v. 30, p. 439-460, 1985.
- STEERE, A. C.; GRODZICKI, R. L.; KORNBLATT, A. N. The spirochetal etiology of Lyme disease. **New England Journal of Medicine**, v. 308, n. 13, p. 733-740, 1983

STAFFORD, K. C.; BLADEN, V. C.; MAGNARELLI, L. A. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds and white-footed mice in Lyme. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 4, p. 453-466, 1995.

STIERNSTEDT, G. T.; GRANSTRÖM, M.; HEDERSTEDT, B.; SKÖLDENBERG, B. Diagnosis of spirochetal meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in serum and cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 819-825, 1985.

STARCOVICI, C. Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krankheiten, die seuchenhafte Hamoglobinurie des Rindes (Babes), das Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). **Zentralblatt für Bakteriologie and Parasitenkunde**, v. 14, p. 1-8, 1893.

STILLER, D.; COAN, M. E. Recent developments in elucidating tick vector relationships anaplasmosis and equine piroplasmiasis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p.97-108, 1995.

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 and Production**, v. 37, n. 8, p. 599-610, 2005.

TAKADA, N.; ISHIGURO, F.; IIDA, H.; YANO, Y.; FUJITA, H. Prevalence of Lyme *Borrelia* in ticks, especially *Ixodes persulcatus* (Acari: Ixodidae), in Central and Western Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 474-478, 1994.

TÄLLEKLINT, L.; JAENSON, T. G. T. Relationship between *Ixodes ricinus* density and prevalence of infection with *Borrelia*-like spirochetes and density of infected ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 805-811, 1996.

TEGLAS, M.; MATERN, E.; LEIN, S.; FOLEY, P.; MAHAN, S. M.; FOLEY, J. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. **Veterinary Parasitology**, v. 131, n. 1-2, p. 119-127, 2005.

TELFORD, S. R.; SPIELMAN, A. Competence of a rabbit-feeding *Ixodes* (Acari: Ixodidae) as a vector of the Lyme disease spirochete. **Journal of Medical Entomology**, v. 26, n. 2, p. 118-121, 1989.

TEMBUE, A. A. M.; SILVA, F. J.; SILVA, J. B.; SANTOS, T. M.; SANTOS, H. A.; SOARES, C. O.; FONSECA, A. H. Risk factors associated with the frequency of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in Southern Mozambique. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 8, p. 663-666, 2011a

TEMBUE, A. A. M.; SILVA, J. B.; SILVA, F. J. M.; PIRES, M. S.; BALDANI, C. D.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; DA FONSECA, A. H. Seroprevalence of IgG antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle from South Mozambique. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 318-324, 2011b.

- THEILER, A. Gall sickness of South Africa (anaplasmosis of cattle). **Journal of Comparative Pathology**, v. 23, p. 98-115. 1910a.
- THEILER, A. *Anaplasma marginale* (gen. and spec., nov.). The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. **Report of the Government on Veterinary Bacteriology in Transvaal**. Department of Agriculture, South Africa, (1908 1909). 1910b. pp.7-64.
- THEILER, A. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. Departamento Agricultural, **First Report of the Director of Veterinary Research**. Union of South Africa, 1911. p.7-46.
- TREES, A. J. The transmission of *Borrelia theileri* by *Boophilus annulatus* (Say, 1821). **Tropical Animal Health Production**, v. 10, n. 2, p. 93-94, 1978.
- THOEN, C. O.; BLACKBURN, B.; MILLS, K.; LOMME, J.; HOPKINS, M. P. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in cattle in a herd in which anaplasmosis was diagnosed. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 499-502, 1980.
- Trabalho de Inquérito Agrícola (TIA). Ministério da Agricultura da República de Moçambique, Maputo, 2008.
- TONG, S.; VON SCHIRNDING, Y. E.; PRAPAMONTO, T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, n. 9, p. 1068-1077, 2000.
- TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D. P.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; SUAREZ, C. E.; MCELWAIN, T. F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region endemicity by Nested PCR and a competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using recombinant major surface protein 5. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 777-782, 1998.
- TRAPE, J. F.; GODELUCK, B.; DIATTA, G.; ROGIER, C.; LEGROS, F.; ALBERGEL, J. PEPIN, Y.; DUPLANTIER, J. M. Tick-borne borreliosis in West Africa: Recent epidemiological studies. **Roezniki Akademii Medyecznei W Bialymstoku**, v. 41, n. 1, p. 136-141, 1996.
- TRUEBLOOD, E. S.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Detection of *Anaplasma marginale* Rickettsia Prior to Onset of Clinical Signs by Using an Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 7, p. 1542-1544, 1991.
- THRUSFIELD, M. Epidemiologia Veterinária. 2ª ed. São Paulo, Roca: 556p., 2004.
- TODOROVIC, R. A., LONG, R. F., MCCALLON, B. R. Comparison of rapid card agglutination test with complement-fixation test for diagnosis of *Anaplasma marginale* infection in Colombian cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 2, p. 167-172, 1977.

- UILENBERG, G. Highlights in recent research on tick-borne disease of domestic animals. **Journal of Parasitology**, v. 72, n. 4, p. 485-491, 1986.
- UILENBERG, G.; HINAIDY, H. K.; PERIÉ, N. M.; FEENSTRA, T. *Borrelia* infections of ruminant in Europe. **Veterinary Quarterly**, v. 10, n. 1, p. 63-67. 1988.
- UILENBERG, G. Babesia-a historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 3-10, 2006.
- UILENBERG, G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 57, n. 1-3, p. 19-41, 1995.
- VAN DER PLOEG, L. H. T.; GOTTESDIENER, K.; LEE, M. G. S. Antigenic variation in african trypanosomes. **Trends Genetics**. v. 8, p. 452-457, 1992.
- VIVAS, R. I. R.; AGUILAR, F. C.; ALPIZAR, J. L. D.; GALERA, L. A. C.; CALDERÓN, J. J. S. Detección de espiroquetas del género *Borrelia* en hemolinfas de teleoginas de *Boophilus microplus* en el estado de Yucatán, México. **Veterinaria México**, v. 27, n. 2, p. 187-188, 1996.
- VISSER, E. S.; McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; DAVIS, W. C.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; KNOWLES, D. P. JR. 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.
- WAGNER, G; CRUZ, D; HOLMAN, P; WAGHELA, S. PERRONE, J; SHOMPOLE, S; RURANGIRWA, R. Non immunologic methods of diagnosis of babesiosis. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 193-199, 1992.
- WALKER, E. D.; MCLEAN, R. G.; SMITH, T. W.; PASKEWITZ, S. M. *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) and *Peromyscus leucopus* in northeastern Wisconsin. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 1, p. 165-168, 1996.
- WALKER, G. T.; BLISS, E. W. World Weather. **Memorial Royal Meteorological Society**, v. 4, p. 53-84, 1932.
- WALTISBUHL, D. J.; GOODGER, B. V.; WRIGHT, I. G.; COMMINS, M. A.; MAHONEY, D. F. An enzyme linked immunosorbent assay diagnose *Babesia bovis* infection in cattle. **Parasitology Research**, v. 73, n. 2, p. 126-131, 1987.
- WANDURAGALA, L.; RISTIC, M. Anaplasmosis. In: **WOLDEHIWET, Z., RISTIC, M.** Rickettsial and Chlamydial diseases of domestic animals. Oxford: Pergamon Press, 1993, p.65-83.
- WELLS, S. J.; TRENT, A. M.; ROBINSON, R. A.; KNUTSON, K. S.; BEY, R. F. Association between clinical lameness and *Borrelia burgdorferi* antibody in dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n.3, p. 398-405, 1993.

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

WILSON, A. J.; TRUEMAN, K. F.; SPINKS, G.; MCSORLEY, A. F. A comparison of 4serological tests in the detection of humoral antibodies to *Anaplasma marginale* incattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, n. 8, p. 383-386, 1978.

WOODWARD, A.; HALES, S.; LITIDAMU, N.; PHILLIPS, D.; MARTIN, J. Protecting human health in a changing world:the role of social and economic development. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, n. 9, p. 1148-1155, 2000

WMO (WORLD METEOROLOGICAL ORGANISATION), No. 905 with UNESCO, UNEP and ICSU The 1997-1998 El Niño event: a **scientific and technical retrospective**, New York editor, United Nations Environment Programme and the International Council for Science, 2000..1-98p

WORLD BANK, Mozambique development report. 2009a. Disponível em: <http://www.worldbank.org.vn/data_pub/reports/Bank1/rep34/statisti.pdf>. (acesso em 8 de Março de 2011).

WORLD BANK. Disponível: <http://www.worldbank.org/data/countrydata/aag/vnm_aag.pdf>. 2009b. (acessado em Março 2011).

WRIGHT, I. G.; GOODGER, B. V.; BUFFINGTON, G. D.; CLARK, I. A.; PARRODI, F.; WALTISBUHL, D. J. Immunopathophysiology of babesial infections. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 11-13, 1989, Supl.

WRIGHT, I. G. Observation on the hematology of experimentally induced *Babesia argentina* and *B.bigemina* infections in splenectomised calves. **Research in Veterinary Science**, v. 14, n. 1, p. 29-34, 1973.

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

YERUHAM, I.; AVIDAR, Y.; AROCH, I.; HADANI, A. Intra-uterine Infection with *Babesia bovis* in a 2-day-old calf. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 50, n. 2, p. 60-62, 2003

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

YOUNG, A. S.; GROOCOCK, C. M.; KARIUKI, D. P. Integrated control of ticks and tick-borne diseases of cattle in Africa. **Parasitology**, v. 96, n. 2, p. 403-441, 1988.

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

ZINGG, B. C.; LEFEBVRE, R. B. Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia coriacea*, putative agent of epizootic bovine abortion. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 11, p. 1509-1515, 1994.

ZINTL, A.; GRAY, J. S., SKERRETT, H. E, MULCAHY, G. Possible mechanisms underlying Age-related resistance to bovine babesiosis. **Parasite Immunology**, v. 27, n. 4, p. 115-120, 2005

11 Apêndices

Apêndice 1

Questionário

Características das criações

Data: / /2010

Características Gerais

Localização: _____

Altitude: _____

1. Dados do responsável:

Nome do criador: _____

Telefone para contato: _____

Localidade: _____

Administração: () criador, () Gestor contratado, () outro: _____

Atividade principal: () produção agrícola, () produção de carne, () produção de carne e agrícola

Outras atividades: _____

2. Raça dos animais: () Nguni, () Brahman, () Mestiços, outras _____

3. Número de animais: () 1-5 _____, () 6-10 _____, () 11-20 _____, () 21-50 _____, > 50 _____

4. Número de animais por categoria: () Touros, () Bois, () Vacas, () Novilhos, () Novilhas, () Vitelos, () Vitelos

5. Venda de animais: () Touros, () Novilhos/as, () Bois para tração

6. Compra de animais: () Touros, () Novilhos/as

Manejo Alimentar

7. Pasto e forragens: () *Panicum maximum*, () *Brachiaria decumbens*, () *Themeda triandra*, () *Cenchrus ciliaris*, () Pasto verde, () outro _____

8. Sistema de criação: () Intensiva () Semi-intensiva () Extensiva

9. Divisão de cercados: () sim, () Não

10. Faz rotação de pastagens? () sim () não

11. Faz limpeza das pastagens: () sim () não, () mecanizada, () Química

12. Tipo de suplementação: () capim elefante, () cevada, () silagem, () milho, () sal mineral, outro _____

Manejo Reprodutivo

13. Possui sistema de controle reprodutivo: () sim () não

() manual em fichas ou cadernos, () informatizado, () informatizado com programas específicos

14. Reprodução animal: Tem épocas de monta natural, () sim, () Não, quantos reprodutores tem na criação _____

Assistência Veterinária

15. Possui assistência veterinária: () Não, () Técnico agro-pecuário, () Extensionista da rede pública, () Extensionista da rede de ONGs, Médico-veterinário, () outro _____

Características da produção

16. Destino da carne: () consumo familiar, () venda, () outro _____

17. Mão-de-obra: () familiar, familiar e contratada, () somente contratada

18. Número de funcionários: _____

19. Grau de escolaridade dos funcionários: () analfabeto, () Ensino primário incompleto, Ensino primário completo, () Ensino médio completo, () Ensino médio incompleto, () Ensino técnico profissional completo, () Ensino técnico profissional incompleto, Técnico superior, outro _____

Outras características

Possui outros animais de produção: () sim, () não, () caprinos, () ovinos, () asininos, () bubalinos, () galináceos, () suínos, () outras aves: _____

20. Possui outros animais domésticos: () cães () gatos () outros: _____

Os animais compartilham da mesma pastagem ou área: () sim, () não, () caprinos, () ovinos, () asininos, () bubalinos, () suínos, () galináceos, () outras aves _____

Características dos produtores

21. Idade: _____

22. Grau de escolaridade do criador: () analfabeto, () ensino primário incompleto, () ensino primário completo, () ensino médio incompleto, () ensino médio completo, () ensino técnico, () ensino superior.

23. Profissão: _____

24. A quanto tempo cria animais _____

25. Atualiza-se sobre a sua atividade? () sim () não

26. Com que frequência se atualiza () semestral () anual

27. Qual a fonte de informação? () Associação de produtores, () outros produtores, () família, outra fonte _____

28. Área que busca aperfeiçoamento: () mão-de-obra, () manejo, () reprodutivo () produção () outra _____

Percepção dos produtores sobre a atividade pecuária

29. Qual o maior entrave na produção de carne? () custo/benefício, () falta de políticas e incentivos governamentais, () falta de extensão rural, () produtor não coopera com as autoridades, () outro _____

30. Já ouviu falar de doenças transmitidas por carrapatos? () sim () Não

31. Qual a que considera mais importante? _____

32. Quais vacinas você aplica em seu rebanho? () Febre aftosa, () Carbúnculo hemático, () Carbúnculo sintomático, () Brucelose, () Dermatose nodular

33. Parasitose que considera mais importante: () carrapatos () helmintose () moscas

34. Quando o seu animal está doente a quem trata? () proprietário, () extensionista, Médico veterinário, () outro _____

35. Como vê o futuro da pecuária na tua região _____

36. Os criadores participam em atividades coletivas? () sim () não

De que forma? _____

37. Em que aspecto acha que os criadores poderiam melhorar? _____

38. O que entende por produtividade? Acertou? () sim () não

Percepção dos produtores sobre a biologia de carrapatos

39. Qual a região do corpo mais afetada? () úbere () pescoço () axila () outra: _____

40. Porquê dessa região ser a mais afetada? () lugar mais protegido, () próxima do chão () Outra: _____

41. Quanto tempo o carrapato fica sobre os animais (tempo de vida parasitária)? _____

42. Quanto tempo o carrapato sobrevive nas pastagens? _____

43. Qual a época mais propícia ao aparecimento de carrapatos? () verão () inverno () chuva () seca

44. Número de ovos em uma postura das fêmeas de carrapato? _____

45. Quantas espécies de carrapato parasitam os bovinos? _____

46. Conseguem diferenciar estágios de vida? _____

47. Os seus animais são resistentes a carrapatos? _____

48. Conhece algum animal que se alimenta dos carrapatos dos bovinos? _____

Percepção dos produtores sobre a importância dos carrapatos na sanidade do rebanho e no processo produtivo tais *Rhipicephalus microplus*, *R. geigyi*, *R. decoloratus* e *R. evertsi evertsi*, *R. appendiculatum*, *R. zambeziensis*, *Amblyomma hebraeum*, *A. variegatum*, etc

49. O parasitismo causa perda de carne? () sim () não

50. Quanto (%) se perde por infestação carrapatos? _____

51. Outros prejuízos? _____

52. O parasitismo por carrapato pode causar morte? () sim () não

53. Conhece as doenças transmitidas por carrapatos para os animais? () sim () não
Quais? _____

54. Conhece os sinais que a doença pode causar no animal? _____

55. Ocorre doenças transmitidas por carrapatos na sua criação? () sim () não

56. Quantos casos clínicos observaram em seu rebanho ano passado? Touros _____, Bois
____ vacas: _____ Novilhas: _____ Vitelos/as _____

57. Teve animais mortos no ano passado? Touros _____, Bois _____ Vacas:
_____ Novilhas: _____ Vitelos/as _____

58. Quando trata o animal contra das doenças transmitidas por carrapatos?

59. Quais produtos são usados para tratar os animais doenças?

60. Quem orienta o tratamento dos seus animais? () Técnico Extensionista, Médico veterinário, outro _____

Percepção dos produtores sobre o controle de carrapatos

Método de controle e resistência

61. Como faz o controle de carrapatos?: _____

62. Tipo de equipamento utilizado para aplicação do carrapaticida: () Tanques carrapaticidas () bomba manual () bomba mecânica () *Pour-on* () injetável

63. Quando trata os animais contra carrapatos: () Muitas larvas, () Muitas fêmeas ingurgitadas, () Épocas determinadas, () outros _____

64. Escolha da dose utilizada por animal: () Indicação do fabricante, () Indicação do técnico, () Vendedor, () extensionista

65. São banhados no mesmo dia: () todos os animais, () mais infestados, () Outros criadores

66. Regiões do corpo banhadas: () Todo do corpo do animal, () partes mais afetadas,

67. Os animais são contidos para o banho? () sim () não

68. Quantos animais são banhados com 20 litros de solução carrapaticida?

69. Com que frequência realiza os banhos carrapaticidas? () seminal () duas vezes por mês, () quando tiverem carrapatos outra: _____

70. Quem realiza as aplicações dos produtos carrapaticidas? () criador () técnico () administrador () funcionário () outro: _____

71. Tem supervisão ou acompanhamento durante a preparação da solução e aplicação do carrapaticida? () sim () não Quem? _____

72. Existe um produto que já usou e não usa mais? () sim () não
Qual? _____

73. Porque parou de usar o produto? () efeito indesejável, () não encontra mais nas lojas, () custo alto, () não produz o efeito esperado, () outros: _____

74. O que pode favorecer o desenvolvimento de carrapatos resistentes a carrapaticidas?

75. Percebe que existem carrapatos resistentes a algum tipo de carrapaticida em sua propriedade? () sim () não
76. Tem algum tipo de orientação sobre o controle de carrapatos? () O próprio produtor, () Técnico extensionista, () Médico Veterinário, () Outros criadores, () Recomendação de vendedores de lojas, () outra: _____
77. Faz uso dos equipamentos de segurança individual durante os banhos carrapaticidas? () sim () não, Quais? _____
78. Já teve algum tipo de problema com produtos carrapaticidas em sua propriedade? () sim () não, Quais? _____
79. Conhece equipamentos de proteção individual () sim () não
80. Muda de produto por quê? () Perda da eficiência () Procura o mais barato () Recomendação do vendedor, () Recomendação técnica () Outra: _____
81. Produtos utilizados: () na última aplicação, () este ano, () ano passado, () carrapaticida
82. Tem contato com outros criadores? () sim, () não
83. Ouviu falar de doenças transmitidas por carrapatos? () sim, () não
84. Ouviu falar de doenças zoonóticas? () sim, () não

(Antônio Amélia Mucalane Tembue, DVM, M.Sc.)

Apêndice 2

Relação dos produtores entrevistados, sua origem geográfica e o efetivo bovino, nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, Região Sul de Moçambique, 2010.

Nome do produtor	Província	Distrito	Localidade	Efetivo bovino
1	Inhambane	Zavala	Chitsuleta	5
2	Inhambane	Zavala	Chitsuleta	9
3	Inhambane	Zavala	Chitsuleta	3
4	Inhambane	Zavala	Chitsuleta	2
5	Inhambane	Zavala	Chitsuleta	9
6	Inhambane	Zavala	Chitsuleta	1
7	Inhambane	Zavala	Chitsuleta	5
8	Inhambane	Zavala	Chissibuca	147
9	Inhambane	Zavala	Chissibuca	117
10	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	3
11	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	5
12	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	6
13	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	4
14	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	3
15	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	5
16	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	3
17	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	3
18	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	4
19	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	3
20	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	5
21	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	4
22	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	3
23	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	5
24	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	3
25	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	3
26	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	4
27	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	3
28	Inhambane	Zavala	Nhamasso-Chambule	4
29	Gaza	Bilene	Mazivila	18
30	Gaza	Bilene	Mazivila	12
31	Gaza	Bilene	Mazivila	20
32	Gaza	Bilene	Mazivila	9
33	Gaza	Bilene	Mazivila	11
34	Gaza	Bilene	Mazivila	10
35	Gaza	Bilene	Mazivila	35
36	Gaza	Bilene	Mazivila	4
37	Gaza	Bilene	Mazivila	8
38	Gaza	Bilene	Mazivila	4
39	Gaza	Bilene	Mazivila	54
40	Gaza	Bilene	Mazivila	10
41	Gaza	Bilene	Mazivila	15
42	Gaza	Bilene	Mazivila	6
43	Gaza	Bilene	Mazivila	9

44	Gaza	Bilene	Mazivila	74
45	Gaza	Chokwé	Macarretane	223
46	Gaza	Chibuto	Macalawane	1
47	Gaza	Chibuto	Macalawane	8
48	Gaza	Chibuto	Macalawane	9
49	Gaza	Chibuto	Macalawane	10
50	Gaza	Chibuto	Macalawane	16
51	Gaza	Chibuto	Macalawane	2
52	Gaza	Chibuto	Macalawane	2
53	Gaza	Chibuto	Macalawane	4
54	Gaza	Chibuto	Macalawane	2
55	Gaza	Chibuto	Macalawane	6
56	Gaza	Chibuto	Macalawane	8
57	Gaza	Chibuto	Macalawane	4
58	Gaza	Chibuto	Macalawane	3
59	Gaza	Chibuto	Macalawane	4
60	Gaza	Chibuto	Macalawane	7
61	Gaza	Chibuto	Macalawane	3
62	Gaza	Chibuto	Macalawane	4
63	Gaza	Chibuto	Macalawane	9
64	Gaza	Chibuto	Macalawane	4
65	Gaza	Chibuto	Macalawane	3
66	Gaza	Chibuto	Macalawane	13
67	Gaza	Chibuto	Macalawane	33
68	Gaza	Chibuto	Macalawane	4
69	Gaza	Chibuto	Macalawane	19
70	Gaza	Chibuto	Macalawane	13
71	Gaza	Chibuto	Macalawane	10
72	Gaza	Chibuto	Macalawane	6
73	Gaza	Chibuto	Macalawane	15
74	Gaza	Chibuto	Macalawane	4
75	Gaza	Chibuto	Macalawane	3
76	Gaza	Chibuto	Macalawane	4
77	Gaza	Chibuto	Macalawane	3
78	Gaza	Chibuto	Macalawane	14
79	Gaza	Chibuto	Macalawane	9
80	Gaza	Chibuto	Macalawane	4
81	Gaza	Chibuto	Macalawane	1
82	Gaza	Chibuto	Macalawane	6
83	Gaza	Chibuto	Macalawane	7
84	Gaza	Chibuto	Macalawane	7
85	Gaza	Chibuto	Macalawane	5
86	Gaza	Chibuto	Macalawane	5
87	Gaza	Chibuto	Macalawane	2
88	Gaza	Chibuto	Macalawane	1
89	Gaza	Chibuto	Macalawane	5
90	Gaza	Chibuto	Macalawane	3
91	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	18
92	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	7
93	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	3

94	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	3
95	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	5
96	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	7
97	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	12
98	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	68
99	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	32
100	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	10
101	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	7
102	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	8
103	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	4
104	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	20
105	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	10
106	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	8
107	Gaza	Xai-Xai	Pontinha	10
108	Maputo	Namaacha	Changalane	600
109	Maputo	Magude	Chobela	250
110	Maputo	Magude	Mazimuchopes	80
111	Maputo	Moamba	Chicochane	67

Seroprevalence of IgG antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle from south Mozambique

Soroprevalência de anticorpos de classe IgG contra *Anaplasma marginale* em bovinos da região Sul de Moçambique

António Amélia Mucalane Tembue^{1,2}; Jenevaldo Barbosa da Silva¹; Fábio Jorge Moreira da Silva¹;
Marcus Sandes Pires¹; Cristiane Divan Baldani³; Cleber Oliveira Soares⁴;
Carlos Luiz Massard¹; Adivaldo Henrique da Fonseca^{1*}

¹Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

²Central Veterinary Laboratory – CVL, Directorate of Animal Science – DCA, Institute for Agrarian Research of Mozambique – IIAM

³Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Gado de Corte, Área Sanidade Animal

Received April 06, 2011

Accepted July 13, 2011

Abstract

The current study aimed to investigate the seroprevalence of IgG antibodies to *Anaplasma marginale* in cattle from Maputo, Gaza and Inhambane provinces, south Mozambique. A total of 809 serum samples from cattle were obtained and tested by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA). The chi-square test at 5% significance was used to assess the association between seroprevalence and the variables gender, age and geographic origin of animals. The overall seropositivity was 76.5% (n = 619) and anti-*A. marginale* antibodies were detected in 89.1% (n = 156), 68.4% (n = 308) and 84.2% (n = 155) of the animals in the provinces of Maputo, Gaza and Inhambane, respectively. A significant association (p < 0.05) was found with the geographic origin of the animals, while sex had no significant relationship. The frequencies of seropositive in the age groups were 63.2% (n = 72), 80.0% (n = 92), 83.1% (n = 98) and 77.3% (n = 357) for animals <12; >12 and ≤24; >24 and ≤36; >36 months, respectively. These results indicate that in southern Mozambique there are areas of enzootic stability to *A. marginale*. Thus, epidemiological monitoring is required to monitor the immune status of animals in the region.

Keywords: Bovine anaplasmosis, epidemiology, serological, Mozambique.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi investigar a soroprevalência de anticorpos da classe IgG contra *Anaplasma marginale* em bovinos de corte da região Sul de Moçambique. Para esse efeito, 809 amostras de soro foram coletadas e avaliadas pelo ensaio imunoadsorção enzimático indireto (ELISA-i). O teste Qui-Quadrado, a 5% de significância, foi utilizado para avaliar a associação entre a soroprevalência e as variáveis sexo, idade e origem geográfica dos animais. A soropositividade geral foi de 76,5% (n = 619), e anticorpos anti-*A. marginale* foram detectados em 89,1% (n = 156), 68,4% (n = 308) e 84,2% (n = 155) dos animais nas províncias de Maputo, Gaza e Inhambane, respectivamente. Uma associação significativa (p < 0,05) foi observada entre a origem geográfica dos animais, enquanto o sexo não demonstrou uma relação significativa. A frequência de soropositivos com relação à faixa etária foi de 63,2% (n = 72), 80,0% (n = 92), 83,1% (n = 98) e 77,3% (n = 357) para animais de <12; >12 a ≤24; >24 ≤36; >36 meses, respectivamente. Os resultados demonstram que, no Sul de Moçambique, existem áreas de estabilidade enzoótica para *A. marginale*, em animais maiores de 12 meses. Assim, monitoramento epidemiológico deve ser realizado para o acompanhamento do status imunológico dos animais na região.

Palavras-chave: Anaplasmoze bovina, epidemiologia, sorologia, Moçambique.

*Corresponding author: Adivaldo Henrique da Fonseca
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária,
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil
e-mail: adivaldofonseca@yahoo.com

Introduction

Livestock production has grown significantly since the mid-1990s in Mozambique as a result of the importation of cattle from neighboring countries in the implementation of livestock restocking program. However, this increase in cattle production was not followed by improvement of sanitary conditions of breeding animals, which has led to the occurrence of many diseases, among which are noteworthy the ones transmitted by ticks, such as anaplasmosis, babesiosis, ehrlichiosis and theileriasis (SIMUUNZA et al., 2011). These diseases have led to a decrease in productive and reproductive efficiency of livestock, in addition to mortality of more than half of the animals (MARTINS et al., 2008).

Anaplasmosis causes severe damage to animal health and has great economic impact on livestock in tropical regions (ALFREDO et al., 2005; JONSSON et al., 2008). Tick-borne diseases have been suspected as being responsible for 50% mortality in cattle (MARTINS et al., 2008). The dynamics of infection by *Anaplasma marginale* depends on several factors, including transmission capacity of the vector, susceptibility of cattle which can vary among race, age, and physiological and immune status. In addition, agro-ecological and edaphic-climatic conditions of each geographic region should also be considered (BOCK et al., 1997; JONSSON et al., 2008). Anaplasmosis is transmitted by ixodid ticks of the genus *Rhipicephalus*, *Hyalomma* spp., *Dermacentor* spp., especially *Rhipicephalus microplus* (UILENBERG, 1995; DE WALL, 2000; JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Other forms of transmission include mechanical means by hematophagous arthropods such as *Tabanus*, *Stomoxys*, and mosquitoes (SCOLES et al., 2005), fomites (REEVES; SWIFT, 1977) and through placenta during pregnancy (POTGIETER; VAN RENSBURG, 1987). In Mozambique, *A. marginale* transmission vectors are ticks of the genera *Rhipicephalus*, *Hyalomma* spp. and other arthropods, such as a horsefly *Stomoxys*, and mosquitoes. Fomites, mainly due to mandatory vaccination in the country, are also important (SCOLES et al., 2005). In addition, direct losses due to mortality caused by anaplasmosis are estimated to be more than 50% of domestic bovine animals (MARTINS et al., 2008).

This pathogen causes massive extravascular destruction of red cells in their hosts; autoantibodies appear with disease progression and adhere to infected and uninfected erythrocytes, increasing red blood cell phagocytosis by macrophages, mainly in the spleen and bone marrow. Reduced corpuscular volume and progressive anemia occur and may lead to death (RISTIC, 1960).

The seroepidemiological study of bovine anaplasmosis in a given geographical area is important because it can demonstrate the possibility of outbreak occurrence. Indirect methods, which detect antibodies against *A. marginale* surface antigens, are essential tools for assessing the prevalence and the immune status of animals and can provide useful information for the control of tick vectors (MAHONEY, 1975; POTGIETER, 1979). Most common serological tests include rapid card agglutination test, indirect immunofluorescence assay (IFA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Moreover, several researchers have demonstrated that indirect ELISA is the test with higher diagnostic sensitivity

and specificity (KNOWLES et al., 1996; GITAU et al., 1997; TRUEBLOOD et al., 1991; MADRUGA et al., 2000).

The current study aimed to investigate the prevalence of IgG antibodies against *A. marginale* by indirect ELISA, and to assess whether gender, age and geographic area of origin are potential risk factors in cattle from the provinces of Maputo, Gaza and Inhambane, south Mozambique.

Materials and Methods

1. Study area

The study was conducted in the provinces of Maputo, Gaza and Inhambane located in the southern region of Mozambique (25° 58' S latitude, 32° 35' E longitude, 120 m altitude), with an area of approximately 167,641 km² and a population density of 29.1 inhabitants/km² (INE, 2010). The area comprises 53.6% of national cattle population, estimated in 902,579 heads (INE, 2008). The districts studied in each province were: Magude, Moamba and Namaacha in Maputo; Bilene, Chibuto, Chokwé and Xai-Xai in Gaza; and district of Zavala in Inhambane (Figure 1).

The climate is predominantly tropical and humid, with warm summer and cold winter. The average temperature ranges from 24 to 40 °C during the summer (October to April) and 18 to 23 °C during the winter (May to September). In addition, average precipitation ranges from 600 to 800 mm and occurs mostly between October and April.

2. Animals and serum samples

Serum samples were obtained from a total of 809 *Bos indicus* cattle from 110 rural smallholder communities located in the provinces of Maputo, Gaza and Inhambane, south Mozambique. Animals were raised in plain agro-ecological areas under different management systems. However, extensive management system predominated. The study was carried out between January and March 2010 and cattle owners participated voluntarily in this study.

Non-probability convenience sampling was used following proportional stratification for each administrative region studied. In each rural smallholder community samples were taken in order to represent 10% or more of the total herd in each farm. The number of blood samples was calculated using an expected prevalence of 34% (ALFREDO et al., 2005), sampling error of 3.5%, according to the equation described by Sampaio (2002): $n = z^2 \cdot p(1-p)/d^2$, where n = sample size; z = constant 1.96; p = expected prevalence, d^2 = desired absolute precision.

Blood samples were collected aseptically by venipuncture of the coccygeal vein into 10 mL tubes without anticoagulant using vacuum system. Serum samples were obtained by centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes and were stored at -20 °C until serological assays were performed.

The animals were categorized by age (<12 months; >12 and ≤24 months; >24 and ≤6 months and >36 months), sex (males and females) and geographic origin (Maputo, Gaza and Inhambane).



Figure 1. a) Map of Africa and geographical location of Mozambique; b) Map of Mozambique indicating the southern region; c) Study sites in three provinces. 1. Chitsuleta, 2. Nhamaso-Chambule, 3. Chissubuca, 4. Bilene, 5. Chokwé, 6. Chibuto, 7. Xai-Xai, 8. Magude, 9. Moamba, 10. Namaacha.

3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Indirect ELISA was performed to detect anti-*A. marginale* IgG antibodies according to Araújo et al. (2005). Optimization of the reaction was established in preliminary experiments through block titration of reagents, testing of different antigen concentrations, positive and negative control serum dilutions and enzymatic conjugate dilutions. Microplates (Corning® Costar® 3590, USA) were coated with recombinant MSP5 of *A. marginale*, supplied by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) Beef Cattle, Mato Grosso Sul, Brazil, and then blocked with PBS Tween-20 at 0.1% (PBS-T) and skim milk at 5% (PBS-TM). Next, plates were incubated with cattle sera diluted at 1:800 in PBS-T, followed by incubation with anti-bovine IgG horseradish peroxidase conjugate (Sigma Chemical Co, USA), diluted at 1:10,000 in

PBS-T. The reaction was developed by adding the enzyme substrate (o-phenylene diamine dihydrochloride (OPD; Sigma) and was stopped by the addition of H_2SO_4 (2.5 N). The optical density (OD) was read at 492 nm in plate reader (Lab systems IEMS Reader MF). Positive and negative control sera were included in each plate and all tests were performed in duplicates. The reaction cutoff was set as two and a half times the mean absorbance of the negative group control sera, and all readings above the cutoff were considered positive. The immunological reactivity of each serum was calculated by determining the sample to positive serum ratio (S/P), considering positive and negative sera as reference, using the following equation: (mean sample absorbance – mean absorbance of negative serum reference) / (mean absorbance of positive reference serum – mean absorbance of negative serum reference), as described by Machado et al. (1997).

4. Statistical analysis

The frequencies of seropositivity according to different categories (age, gender and origin) were calculated and evaluated by the chi-square test (χ^2) at a significance level of 5% using the statistic program BioEstat version 4.0 (AYRES et al., 2005).

Results

Of the 809 sera analyzed by ELISA, 76.5% (n = 619) showed anti-*A. marginale* IgG antibodies. The seroprevalence of bovine anaplasmosis in the provinces of Maputo, Gaza and Inhambane and the association with different factors studied are shown in Table 1.

Regarding cattle age, positive sera were found in all age groups and anti-*A. marginale* seropositivity was associated ($p < 0.05$) with age. Cattle aged up to 12 months had lower seropositivity compared to those aged between 12 and 24 months, 24 and 36 months and animals older than 36 months, being 63.2% (n = 72), 80.0% (n = 92), 83.1% (n = 98) and 77.3% (n = 357) positive for anti-*A. marginale* IgG antibodies, respectively. The prevalence ratio (Table 2) showed that cattle aged over 12 months were 4 to 27% more likely to be exposed to *A. marginale* ($p < 0.01$). As for animal gender, no association ($p > 0.05$) with seropositivity to *A. marginale* was found.

Maputo province had a higher frequency rate ($p < 0.05$) of seropositive cattle by ELISA compared to the two other provinces and anti-*A. marginale* antibodies were detected in 89.1% (n = 156), 84.2% (n = 155) and 68.4% (n = 308) of the animals in Maputo, Inhambane and Gaza, respectively (Table 1). The prevalence rate showed that cattle in the provinces of Maputo and Inhambane were 6 and 23% ($p < 0.01$) more likely to be exposed to *A. marginale* (Table 2).

The frequency of bovines positive to *A. marginale* in the districts followed the same pattern observed for the provinces (Table 1). However, the Moamba district in the province of Maputo had the highest frequency of seropositive cattle, 93.8% (n = 45). On the other hand, Chibuto district in the province of Gaza, had the lowest frequency of seropositive cattle, 47.9% (n = 78).

Discussion

In the current study the occurrence of antibodies against *A. marginale* in cattle from south Mozambique was investigated by ELISA. The study results demonstrated that these ruminants are exposed at a high frequency to this hemoparasite in the region studied. It is the first evidence of this agent in the region.

Anti-*A. marginale* IgG antibodies were detected in 76.5% (n = 619) of the animals, of which 89.1% (n = 156), 68.4% (n = 308) and 84.2% (n = 155) were in the provinces of Maputo, Gaza and Inhambane, respectively. This seropositive rate is higher than 34.4% reported by Alfredo et al. (2005) in a similar study conducted in the province of Tete, central Mozambique, in areas of semi-arid and arid climate and high altitude. Moreover, the prevalence of *A. marginale* in the current study was higher than 75.0% in all districts except Chibuto, located in Gaza province

Table 1. Prevalence of antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle from Maputo, Gaza and Inhambane provinces, southern Mozambique, detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA) and factors associated.

Factor	N	<i>Anaplasma marginale</i>	
		n	%
Prevalence	809	619	76.5
Age (months)			
<12	114	72	63.2 ^a
>12 to ≤ 24	115	92	80.0 ^b
>24 to ≤ 36	118	98	83.1 ^b
>36	462	357	77.3 ^b
Gender			
Female	495	379	76.6 ^a
Male	314	240	76.4 ^a
Maputo	175	156	89.1 ^A
Moamba	48	45	93.8 ^a
Magude	79	70	88.6 ^b
Namaacha	48	41	85.4 ^b
Inhambane	184	155	84.2 ^B
Chitsuleta	61	50	82.0 ^a
Nhamaso-Chambule	59	51	86.4 ^a
Chissibuca	64	54	84.4 ^a
Gaza	450	308	68.4 ^C
Bilene	104	92	88.5 ^a
Chokwé	47	36	76.6 ^a
Xai-Xai	136	102	75.0 ^a
Chibuto	163	78	47.9 ^b

N = number of animals by factor; n = number of samples positive to *A. marginale*. The values in the same column followed by a different letter show a statistically significant difference among groups or factors in test χ^2 ($p < 0.05$).

(Table 1), which showed a rate of 47.9%. This lower prevalence rate is probably due to the use of intensive health management in Chibuto, characterized by acaricide dip at weekly intervals, possibly affecting the population of vector ticks.

In southern Mozambique cattle raising is predominantly beef cattle, consisting mostly of *Bos indicus* breeds and their crosses, which are naturally tolerant to tick parasitism (JONSSON et al., 2008). Hence, the results of the current study demonstrate great transmission potential in the area studied and points out the importance of control measures.

Studies in other countries in the Eastern and Southern regions of Africa indicate that *A. marginale* is widely distributed with a prevalence ranging from 32.1 to 100.0% (LATIF et al., 1995; DREYER et al., 1998). These results demonstrate not only areas of stability, but also situations of enzootic instability between countries or regions, which may be associated to hygienic-sanitary management and soil and edaphic-climatic conditions that affect the survival of *A. marginale* vectors (SCOLES et al., 2005; JONSSON et al., 2008). In Zambia, the prevalence of *A. marginale* demonstrated by ELISA was 85.7, 85.9, 84.7 and 75.0% in provinces located at Western, Central, Eastern and Southern areas of the country, respectively (JONGEJAN et al., 1988). In addition, several studies in South Africa using ELISA as the diagnostic test reported

Table 2. Prevalence ratio of antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle from Maputo, Gaza and Inhambane provinces, southern of Mozambique, detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA) and factors associated.

Factor	N	<i>Anaplasma marginale</i>				
		n ^a	% ^b	PR	95% CI ^c	p-value ^d
Age (months)						
<12	114	72	63.2	1		
>12 to ≤24	115	92	80.0	1.27	1.07-1.50	0.00
>24 to ≤36	118	98	83.1	1.04	0.92-1.17	0.33
>36	462	357	77.3	1.07	0.98-1.18	0.11
Province						
Gaza	450	308	68.4	1		
Inhambane	184	155	84.2	1.23	1.13-1.34	0.00
Maputo	175	156	89.1	1.06	0.98-1.15	0.11
Districts						
Moamba	48	45	93.8	1		
Magude	79	70	88.6	1.06	0.95-1.18	0.26
Namaacha	48	41	85.4	1.10	0.96-1.26	0.16
Bilene	104	92	88.5	1.06	0.96-1.17	0.23
Nhamaso-Chambule	59	51	86.4	1.02	0.91-1.16	0.45
Chissibuca	64	54	84.4	1.02	0.89-1.19	0.47
Chitsuleta	61	50	82.0	1.03	0.88-1.21	0.45
Chokwé	47	36	76.6	1.22	1.03-1.46	0.02
Xai-Xai	136	102	75.0	1.25	1.11-1.41	0.01
Chibuto	163	78	47.9	1.96	1.64-2.34	0.00

N = Number of animals by factor; PR = Prevalence ratio; ^aNumber of positive samples; ^bPrevalence; ^cConfidence interval and ^dp-value.

seropositive rates for bovine anaplasmosis ranging from 87 to 100% (DREYER et al., 1998; MBATI et al., 2002; MTSHALI et al., 2004; MTSHALI et al., 2007; NDOU et al., 2010).

In the United Republic of Tanzania, the prevalence of *A. marginale* was reported as being 37.0 and 40.0% in Iringa and Tanga region, respectively (SWAI et al., 2005). Moreover, in Kenya, in the East Africa region, a seroprevalence of 32.1 to 36.0% was observed, which is much lower than that reported in other African areas (LATIF et al., 1995; OKUTHE; BUYU, 2006). Therefore, differences in prevalence of bovine anaplasmosis between different geographic regions of the same continent may occur.

In the current study, no association ($p > 0.05$) was seen between seropositivity to *A. marginale* and gender. These results demonstrate that infection with *A. marginale* in the provinces of Maputo, Gaza and Inhambane is independent of this parameter (Table 1), a finding that is consistent with other studies (SOARES et al., 2000; SOUZA et al., 2000; TRINDADE et al., 2010). On the other hand, statistical significant difference in the prevalence of *A. marginale* was found among the three age groups studied (Table 1). Similar results were reported by Bock et al. (1997) who showed that factors such as race, age, physiological and immunological status may affect seropositive rates. It is noteworthy that parasite inoculation rate by other biological vectors (DREYER et al., 1998; MTSHALI et al., 2007; NDOU et al., 2010) and other sources of mechanical transmission via blood-sucking dipterans and fomites (SCOLES et al., 2005) may also affect the enzootic stability of any geographic area when *A. marginale* is prevalent. Additionally, the lowest seropositivity ($p < 0.05$) seen in cattle aged up to 12 months can be explained by immune protection due to colostral antibodies and/or low rate of inoculation of *A. marginale* by the

vectors as the animals in this age group have much lower contact with the vectors compared to older ones (JONSSON et al., 2008).

There were only a few previous reports on the prevalence of bovine anaplasmosis in Mozambique in other areas (ALFREDO et al., 2005). To our best knowledge, this is the first report on the prevalence of *A. marginale* in Maputo, Gaza and Inhambane provinces, Mozambique. These data may provide valuable input to managers of national livestock and can help understanding the immunological status of herds as well as planning future interventions for animal health. Further studies are needed to monitor herds and identify other factors that may pose an epidemiological risk in the region.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Flávio R. Araújo and National Research Center for Beef Cattle of the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Gado de Corte), and Embrapa Agrobiologia for the use of their laboratory facilities; the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Ministry of Science and Technology of the Republic of Mozambique (MCT-Mz) for their financial support and the opportunity granted to us.

References

- ALFREDO, A. A. N. et al. Serological survey of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle in Tete province, Mozambique. *Tropical Animal Health and Production*, v. 37, n. 2, p. 121-131, 2005. PMID:15742867. <http://dx.doi.org/10.1023/B:TROP0000048513.80797.97>

- ARAÚJO, F. R. et al. Development of enzymelinked immunoabsorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 765-769, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000700016>
- AYRES, M. et al. **BioEstat 4.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Belém: Editora Sociedade Civil Mamirauá, 2005. 324 p.
- BOCK, R. E. et al. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis* e *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 5, p. 337-340, 1997.
- DE WALL, D. T. Anaplasmosis control and diagnosis in South Africa. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 474-483, 2000. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05327.x>
- DREYER, K.; FOURIE, L. J.; KOK, D. J. Epidemiology of tick-borne diseases of cattle in Botshabelo and Thaba Nchu in the Free State province. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 4, p. 285-289, 1998.
- GITAU, G. K. et al. The prevalence of serum antibodies to tick-borne infections in cattle in smallholder dairy farms in Murang' District, Kenya; a cross-sectional study. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 30, p. 95-107, 1997. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5877\(96\)01100-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5877(96)01100-2)
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA - INE. Disponível em: <www.ine.gov.mz>. Acesso em: 24 nov. 2010.
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTATÍSTICA - INE. **Evolução dos Efectivos Pecuários nas pequenas e médias explorações (2002-2006)**. Moçambique, 2006. Disponível em: <http://www.ine.gov.mz/sectorias_dir/Agricultura/agr_ceppe>. Acesso em: 24 nov. 2011.
- JONGEJAN, F. et al. Epidemiology of bovine babesiosis and anaplasmosis in Zambia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 20, n. 4, p. 234-242, 1988. PMID:3070875. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02239989>
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. S3-S14, 2004. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182004005967>
- 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. 1-2, p. 1-9, 2008. PMID:18472219. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.022>
- KNOWLES, D. et al. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, 1996.
- LATIF, A. A. et al. An epidemiological study of tick-borne diseases and their effect on productivity of zebu cattle under traditional management on Rusinga Island, Western Kenya. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 22, n. 3, p. 169-181, 1995. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5877\(94\)00408-B](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5877(94)00408-B)
- MACHADO, R. Z. et al. 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. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00003-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00003-4)
- MADRUGA, C. R. et al. Evaluation of an Enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 109-112, 2000. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2000000300004>
- MAHONEY, D. F. The diagnosis of babesiosis in Australia. In: WELLS, E. A. (Ed.). **Workshop on Hemoparasites (Anaplasmosis and Babesiosis)**. Cali: CIAT, 1975. p. 49-62.
- MARTINS T. M. et al. A. Detection of bovine babesiosis in Mozambique by a novel seminested hot-start PCR method. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 3-4, p. 225-230, 2008. PMID:18329810. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.037>
- MBATI, P. A. et al. Ticks and tick-borne diseases of livestock belonging to resource-poor farmers in eastern Free State of South Africa. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, n. 1-4, p.217-224, 2002. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1025306701803>
- MTSHALI, M. S.; DE WAAL, D. T.; MBATI, P. A. A sero-epidemiological survey of blood parasites in cattle in the North-eastern Free State, South Africa. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v. 71, n. 1, p. 67-75, 2004. PMID:17359443. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.00998.x>
- MTSHALI, M. S. et al. Prevalence and genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains in cattle in South Africa. **Zoonoses Public Health**, v. 54, n. 1, p. 23-30, 2007.
- NDOU, R. V. et al. The seroprevalence and endemic stability of anaplasmosis in cattle around Mafikeng in the North West Province, South Africa. **Veterinary Research**, v. 3, n. 1, p. 1-3, 2010.
- OKUTHE, O. S.; BUYU, G. E. Prevalence and incidence of tick-borne diseases in smallholder farming systems in the Western-Kenya highlands. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 307-312, 2006. PMID:16824685. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.016>
- POTGIETER, F. T. Epizootiology and control of anaplasmosis in South Africa. **Journal of South African Veterinary Association**, v. 50, n. 4, p. 367-372, 1979. PMID:399978.
- POTGIETER, F. T.; VAN RENSBURG L. The persistence of colostral *Anaplasma marginale* antibodies and incidence of *in utero* transmission of *Anaplasma marginale* infections in calves under laboratory conditions. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 4, p. 557-560, 1987. PMID:3444609.
- REEVES, J. D.; SWIFT, B. L. Iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician**, v. 72, n. 5, p. 911-914, 1977. PMID:586056.
- RISTIC, M. Anaplasmosis. **Advances in Veterinary Science**, v. 7, p. 111-192, 1960.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Editora Fundação de Estudos e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265 p.
- SIMUUNZA, M. et al. Epidemiological analysis of tick-borne diseases in Zambia. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3-4, p. 331-342, 2011. PMID:21106294. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.027>
- SCOLES, G. A. et al. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) Compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 4, p. 668-675, 2005. [http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585\(2005\)042\[0668:REOBTO\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585(2005)042[0668:REOBTO]2.0.CO;2)
- SOARES, C. O. et al. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 75-79, 2000.

- SOUZA, J. C. P. et al. Soroprevalência de *Babesia bigemina* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 26-30, 2000.
- SWAI, E. S. et al. Seroprevalence estimation and risk factors for *A. marginale* on smallholder dairy farms in Tanzania. **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, n. 8, p. 599-610, 2005. PMID:16619876. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-005-4307-y>
- UILENBERG, G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 19-41, 1995. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)03107-8](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(94)03107-8)
- TRINDADE, H. I. et al. Detection of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in calves from the region of Araguaína, State of Tocantins, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 169-173, 2010. PMID:20943021.
- TRUEBLOOD, E. S. McGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Detection of *Anaplasma marginale* rickettsemia prior to onset of clinical signs by using an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 7, p. 1542-1544, 1991. PMID:1885753. PMCid:270153.

Risk factors associated with the frequency of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in southern Mozambique¹

Antônio A.M. Tembue^{2,3}, Fábio J.M. Silva², Jenevaldo B. Silva², Tiago M. Santos², Huarrisson A. Santos², Cleber O. Soares⁴ and Adivaldo H. Fonseca^{2*}

ABSTRACT. Tembue A.A.M., Silva F.J.M., Silva J.B., Santos T.M., Santos H.A., Soares C.O. & Fonseca A.H. 2011. **Risk factors associated with the frequency of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in southern Mozambique.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(8):663-666. Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail: adivaldo@ufrj.br

The study aimed to evaluate the risk factors associated with the frequency of IgG antibodies against *Babesia bovis* and *B. bigemina* in cattle in southern Mozambique. Eight hundred and nine serum samples were collected from cattle in three provinces namely Maputo, Gaza and Inhambane, and tested by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA) to assess the humoral immune response towards *B. bovis* and *B. bigemina*. The chi-square test at 5% significance was used to determine whether there was an association between gender, age and geographic origin of seropositive animals. The overall prevalence was 78.8% (548/695) for *B. bovis* and 76.0% (528/695) for *B. bigemina*. The origin of the animals showed a significant association ($p < 0.05$) with seropositivity to both agents, while gender and age was not associated ($p > 0.05$). Maputo province had the highest rate of positive animals, with 93.7% (118/126) for *B. bovis* and 97.6% (123/126) for *B. bigemina*. In Gaza province 77.3% (321/415) of the animals were positive for *B. bovis* and 67.5% (280/415) for *B. bigemina*, while in the province of Inhambane the levels of seropositivity were 70.8% (109/154) and 81.2% (125/154) for *B. bovis* and *B. bigemina* respectively. In the present study, the frequency of cattle positive for *B. bovis* and *B. bigemina* was shown to increase among older age groups, suggesting that infection and re-infection persisted even after the primary infection. Thus, this region is considered to be in a state of enzootic stability with regards to *B. bovis* and *B. bigemina*.

INDEX TERMS: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, cattle, babesiosis, epidemiology, Mozambique.

RESUMO. [Fatores de risco associados à frequência de anticorpos contra *Babesia bovis* e *B. bigemina* em bovinos da Região Sul de Moçambique.] Foram avaliados os fatores de risco associados a frequência de anticorpos da classe IgG contra *Babesia bovis* e *B. bigemina* em bovinos da re-

gião sul de Moçambique. Oitocentos e nove amostras de soros foram coletadas de bovinos em três províncias nomeadamente Maputo, Gaza e Inhambane e testados por ensaio de imunoadsorção enzimático indireto (i-ELISA) para avaliar a resposta imune humoral contra *B. bovis* e *B. bigemina*. O teste de Qui-quadrado a 5% de significância foi utilizado para verificar a associação entre as variáveis sexo, faixa etária e origem geográfica com a soropositividade dos animais. A prevalência geral foi de 78,8% (548/695) para *B. bovis* e 76,0% (528/695) para *B. bigemina*. A origem dos animais apresentou associação ($p < 0,05$) com a soropositividade a ambos os agentes, enquanto variável sexo não apresentou associação ($p > 0,05$). A província de Maputo apresentou a maior taxa de animais positivos, com 93,7% (118/126) para *B. bovis* e 97,6% (123/126) para *B. bigemina*. Na província de Gaza a soropositividade foi de 67,5% (280/415) para *B. bigemina* e 77,3% (321/415) para

¹ Received on January 17, 2010

Accepted for publication on April 11, 2011.

Part of the doctoral thesis of first author.

² Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. *Corresponding author: adivaldo@ufrj.br

³ Laboratório Central de Veterinária (LCV), Direção de Ciências Animais (DCA), Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM), Avenida de Moçambique Km1.5, Caixa Postal 1922, Maputo, Moçambique. E-mail: am.tembue@gmail.com

⁴ Embrapa Gado de Corte, Área de Sanidade Animal, BR 262 Km 4, Caixa Postal 154, Campo Grande, MS 79002-970, Brazil.

B. bovis enquanto que na província de Inhambane a positividade foi de 81,2% (125/257) e 70,8% (109/257) para *B. bigemina* e *B. bovis*, respectivamente. Na presente pesquisa, a frequência de bovinos positivos para *B. bovis* e *B. bigemina* aumentou nas faixas etárias superiores, sugerindo que as infecções e as re-infecções persistem mesmo após primo-infecção. A região estudada apresenta-se na condição de estabilidade enzootica para os agentes estudados.

TERMS DE INDEXAÇÃO: *Babesia bovis*, *B. bigemina*, bovinos, babesiose, epidemiologia, Moçambique.

INTRODUCTION

About 902.579 cattle are reared in the southern region of Mozambique, a value equivalent to 53.6% of the national total, estimated at 1.683.589 animals (Tia, 2008). These animals are prone to infection by *Babesia bovis* and *B. bigemina*, which are directly associated with the presence of the ticks *Rhipicephalus microplus*, *R. decoloratus*, *R. everts everts* and *Hyalomma marginatum rufipes* (De Matos 2008).

In the mid-1990s the government of Mozambique implemented a livestock restocking program based on the import of cattle from the Republic of South Africa and Zimbabwe (Martins et al 2008). However, this increase in the production of ruminants in the country was not accompanied by improvements in sanitary conditions, what led to the occurrence of different diseases including the following tick-borne conditions: Babesiosis, anaplasmosis, ehrlichiosis and theileriosis. These diseases negatively affected the productive and reproductive efficiency of livestock by causing the death of more than half the animal population (Simuunza et al 2010).

These pathogens trigger a massive destruction of red blood cells in their hosts, promoting lysis of these cells followed by invasion of other erythrocytes (De Vos et al 2004). Thus, infections with *Babesia* spp. in cattle are characterized by fever, anemia, hemoglobinemia, hemoglobinuria, and in many cases, death (Martins et al 2008).

Babesiosis is responsible for severe damage to the animal and exerts a large economic impact on livestock production in tropical regions (Jonsson et al 2008). The dynamics of infection by *Babesia* spp. depend on several factors, such as size and composition of the population of ticks, the transmission capacity of the vector and the susceptibility of the cattle, which can vary with breed, age and physiological conditions (Bock et al 1997, Jonsson et al 2008) as well as the agro-ecological and edaphic-climatic conditions of each geographical region.

The seroepidemiological study of bovine babesiosis in a given geographical area is important, because it may reveal the potential for outbreaks of this disease. Serological diagnostic methods are essential tools for assessing the prevalence and the immune status of animals as well as generating important information that can be used to control the tick vectors (Mahoney & Ross 1972, Mahoney 1975). The indirect enzyme-linked immunosorbent assay (i-ELISA) is the test that has given better results due to its high level of sensitivity and specificity (Madruga et al 2001).

The objective of the current investigation was to examine possible correlation between gender, age and geographic region as risk factors associated with the prevalence of IgG antibody

against *B. bovis* and *B. bigemina* in cattle from the provinces of Maputo, Gaza and Inhambane, southern Mozambique.

MATERIALS AND METHODS

This study was carried out in the southern region of Mozambique, which occupies an area of 167.641 km², at a latitude of 25°58' south and a longitude of 32°35' east, with an average altitude of 120 meters, characterized by a tropical humid climate (Inam 2010). The current evaluated cattle (*Bos indicus*) and their crossbreed from herds in the provinces of Maputo, Gaza and Inhambane. These provinces account for 53.6% of the national cattle population, equivalent to 902.579 head with 179.028 in inhambane, 569.404 in Gaza and 154.147 in Maputo respectively (Tia 2008).

A total of 809 serum samples were collected. The samples were derived from 110 rural smallholders with 4 located in Maputo, 78 in Gaza and the remaining 28 in Inhambane. The study was carried out between January to March 2010, and cattle owners participated voluntarily in this study. The inference was performed by non-probabilistic sampling, obeying the proportional stratification of each province studied. Thus, in each rural smallholder community samples were taken in order to represent 10% of the total herd.

In order to assess the association between rates of IgG antibodies against *Babesia bovis* and *B. bigemina* and the variables of age, gender and origin, animals were categorized as follows: Age (≥ 6 to ≤ 12 months, and >12 to ≤ 36 months and > 36 months), sex (male and female) and origin (Maputo, Gaza and Inhambane).

Blood samples were collected aseptically by coccygeal venipuncture in 10mL tubes *vacutainer*. Subsequently, the samples from the province of Maputo were transported under refrigeration using ice packs to the Central Veterinary Laboratory (CVL), Directorate of Animal Science (DCA) at the Institute for Agrarian Research of Mozambique (IIAM), samples from Gaza were processed at the Regional Veterinary Laboratory of South-Gaza/IIAM while the samples from Inhambane were processed at the Provincial Livestock Services Laboratory of Inhambane. In all cases, samples were submitted to centrifugation at 2.000xg for 10 minutes in order to separate the clot and obtain serum. About 1mL of serum was separated into polypropylene microtubes of 1.5ml and placed in a freezer at -20°C until the execution of serological tests. Serological analyses were performed at the Laboratory of Parasitic Disease, Department of Epidemiology and Public Health, Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ) and at the Laboratory of the National Center for Research in Agrobiologia, Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Agrobiologia). Serum samples were tested by i-ELISA for the detection of IgG antibodies against *B. bovis* and *B. bigemina* using 96 well microplate 96 (Corning, Costar® 3590, USA). The microplates were previously sensitized with crude antigen of *B. bovis* and *B. bigemina* kindly supplied by National Research Center for Beef Cattle of the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Gado de Corte), and processed according to the technique described by Madruga et al (2001). Plates were read using a microplate spectrophotometer (*Labsystems IEMS Reader MF*) at a wavelength of 492nm. The *cutoff* for i-ELISA was established with the confidence level of 99.5% Frey et al (1998).

The frequency of seropositive cattle of all categories (age, gender and origin) were calculated and differences between groups assessed by using Chi-square (χ^2) at 5% of significance using the statistical software *BioStat*®, version 4.0 (Ayres et al. 2000).

RESULTS

Prevalence values of animals seropositive for *Babesia bovis* and *B. bigemina* in three provinces of southern Mozambique (Maputo, Gaza and Inhambane) are provided in (Table 1). The

Table 1. Prevalence of antibodies against *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in cattle detected by indirect enzyme-linked immunosorbent reaction and associated factors in Southern of Mozambique

Factor	N	<i>Babesia bigemina</i>		<i>Babesia bovis</i>		<i>B. bigemina</i> e <i>B. bovis</i>	
		n	%	n	%	n	%
Prevalence	695	528	76.0	548	78.8	535	77.0
Age (months)							
≥6 the ≤ 12	118	95	80.5 ^A	97	82.2 ^A	85	72.0 ^A
> 12 the ≤ 36	115	90	78.3 ^A	90	78.3 ^A	89	77.4 ^A
> 36	462	343	74.2 ^A	361	78.1 ^A	316	68.4 ^A
Sex							
Females	438	334	76.3 ^A	345	78.8 ^A	326	74.4 ^A
Males	257	194	75.5 ^A	203	79.0 ^A	194	75.5 ^A
Province							
Maputo	126	123	97.6 ^A	118	93.7 ^A	106	84.1 ^A
Inhambane	154	125	81.2 ^B	109	70.8 ^B	120	77.9 ^B
Gaza	415	280	67.5 ^C	321	77.3 ^B	275	66.3 ^C

N = numbers of animals collected, n = numbers of samples positive to *Babesia bigemina* and *B. bovis*. Values in the column followed by same letters do not have statistically significant difference between groups or factors studied (a) by test χ^2 ($p > 0.05$). Values with statistically significant differences between provinces are indicated by different capital letters (A, B and C) by test χ^2 ($p < 0.05$).

results show that the overall prevalences of antibodies against *B. bigemina* and *B. bovis* were 76.0% (528/695) and 78.8% (548/695) respectively.

The percentages of prevalence for *Babesia* spp. determine on the basis of age, gender and geographic region are represented in (Table 1). There was no association ($p > 0.05$) between gender and age seropositivity for either *B. bovis* or *B. bigemina*, on the other hand, while the factors of origin of the animals showed a significant association ($p < 0.05$) with seropositivity to both agents studied.

Analysis of data for *B. bovis* revealed a prevalence of 82.2% (97/118), 78.3% (90/115) and 78.1% (361/462) among animals of age ≥ 6 to ≤ 12 months, > 12 to ≤ 36 and over 36 months, respectively, (Table 1). For *B. bigemina* the seroprevalence was 80.5% (95/118), 78.3% (90/115) and 74.2% (343/462) for the three age groups examined. However, no significant differences were observed among groups aged greater than 12 months $p > 0.05$ (Table 1).

When evaluating the demographic region as a risk factor associated with seropositivity, we found the statistically significant differences between provinces showed the highest frequency ($p < 0.05$) of seropositive cattle for both agents, whereas in the Maputo, Inhambane and Gaza the frequency was 93.7% (118/126), 70.8% (109/154) and 77.3% (321/415) for *B. bovis*, and 97.6% (123/126), 81.2% (125/154) and 67.5% (280/415) for *B. bigemina*, respectively. The prevalence rate showed that cattle in the province of Maputo were more likely to be seropositive for *B. bigemina* and *B. bovis* than animals coming from the provinces of Inhambane and Gaza ($p < 0.05$).

DISCUSSION

The results of this study concur with those of previous other conducted in countries from tropical regions (Jonsson et al 2008). In regions in eastern and southern Africa, studies indicate that bovine babesiosis presents seropositivity ranging

from 19.5 to 94.0% of the cattle (Dreyer et al 1998, Mbata et al 2002, Mtshali et al 2004, Martins et al 2008). In South Africa, these studies showed that the prevalence of antibodies against *Babesia bigemina* ranged from 62.4 to 94.0%, and in the case of *B. bovis* the frequency was 19.5%. In Kenya the prevalence of *Babesia* spp. in cattle was 37.1%, according to the study of Okuthe & Buyu (2006).

In southern Mozambique is raised predominantly beef cattle, consisting mostly of Indian origin breed (*Bos indicus*) and their crossbreed, which are considered to be naturally resistant to parasitism by ticks (Mahoney 1975). However, the prevalence in this region for *B. bovis* and *B. bigemina* was found to be 78.8% (548/695) and 76.0% (528/695) respectively, suggesting great potential for transmission of these agents by ticks prevalent in that area. According to Mahoney & Ross (1972), prevalence rates equal to or greater than 75.0% classify the area as one of enzootic stability. Furthermore, it indicates that the cattle are infected before completing the first year of life, and are constantly re-infected. In this way, the animals maintain their immune system active against the agents in question.

In present study the seroprevalence detected was higher than 75%, characterizing the southern region of Mozambique as an area of enzootic stability for bovine babesiosis. In a situation of enzootic stability, calves are infected during the early months of life and are protected by colostral antibodies (passive immunity), thus enabling the development of active immunity without the manifestation of clinical disease. However, it should be noted that a study examining calves with age below six months (Jonsson et al 2008), it was concluded that under conditions of high tick infestation high morbidity and mortality can occur even in during the period when protection was being conferred by colostral antibodies (Jonsson et al 2008).

The association of gender with the seropositivity of the cattle to *B. bigemina* and *B. bovis* was not significantly different ($p > 0.05$), confirming the findings of previous studies (Sorens et al 2000, Trindade et al 2010).

The statistically significant differences observed in positive cattle from the same provinces studied in relation to the prevalence of antibodies against *B. bovis* and *B. bigemina*, may be due to variation in the rate of infection by ticks and, subsequently, a variation in the rate of cattle inoculation by the infected ticks. The animals are exposed to more risk conditions associated with outbreaks of babesiosis infection by *B. bovis* and *B. bigemina* in cattle was not homogeneous among the same province.

In the current study, the seropositivity for *B. bigemina* 77.3% (321/415) in Gaza province was higher when compared with the level obtained for *B. bovis* 67.5% (280/415). In this province, there exists a higher percentage of *Bos indicus* species, which are considered to more resistant to tick infestation (Madruga et al 1984), and with which higher larval mortality is observed (González 1974).

These data demonstrate that the disease has a varied distribution within the provinces. A previous study of natural infection in bovines of the beef cattle breed from the region the Tete province revealed a seropositivity level of 39.1% for *B. bovis* (Alfredo et al 2005). It is possible that the observed differences between the earlier study and our data may have resulted from a seasonal increase in the tick population, in a

lack of control of such an increase, or from the subsequent introduction of susceptible animals, derived from South Africa and Zimbabwe, during the livestock restocking program.

During the blood collection process, the presence of ticks was observed on all the farms, despite the frequent use of tick control drugs containing pyrethroids and avermectins, as well as a high prevalence of babesiosis. Host and environment are factors that affect the prevalence of babesiosis in a particular region (Mahoney & Ross 1972).

Information in relation to the levels of antibodies against *B. bovis* and *B. bigemina* in cattle in the study areas will provide insights to managers of national livestock to improve their knowledge of the immunological status of herds, and may contribute towards the development of future interventions and management strategies in animal health. In this context, knowing the prevalence of agents in each province, one can develop geo-referenced maps of regions of stability and instability to provide better control of enzootic disease in the country.

The results of this study corroborate the findings from studies conducted in the countries of southern and eastern Africa, where the variation of infection by *B. bigemina* and *B. bovis* depends on factors such as the prevalence of vectors and measures related to their control, but is independent of gender.

We conclude that the southern region of Mozambique should be considered as an area of enzootic stability for both *B. bovis* and *B. bigemina*. Moreover, this region offers risk for transmission of babesiosis to susceptible animals coming from areas of enzootic instability. Therefore, the use of appropriate preventive measures is needed, especially with regard to the effective control of ticks. In these circumstances, further studies would be justified in order to monitor the herds for purpose of identifying factors that may pose risks to the current epidemiological status of the region.

Acknowledgements. - To Prof. Dr. Carlos L. Massard, Flávio R. Araújo and to Embrapa Agrobiologia for their laboratory facilities. To the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and the Ministry of Science and Technology of the Republic of Mozambique (MCT-Mz) for financial support and the opportunity granted.

REFERENCES

- Alfredo A.A.N., Jonsson N.N., Finch T.M. & Neves L. 2005. Serological survey of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle in Tete province, Mozambique. *Trop. Anim. Health Prod.* 37(2):21-131.
- Ayres M., Ayres Jr M., Ayres D.L. & Santos A.A.S. 2000. *BioEstat 4.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Editora Sociedade Civil Mamirauá, Belém. 272p.
- Bock R.E., De Vos A.J., Kingston T.G. & McLellan D.J. 1997. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. *Aust. Vet. J.* 75(5):337-340.
- Bock R., Jackson L., De Vos A. & Jorgensen W. 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitol.* 129(Suppl):247-269.
- De Matos C.A. 2008. Species composition and geographic distribution of ticks infesting cattle, goats and dogs in Maputo province, Mozambique. MSc. Dissertation in Veterinary Science, Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria. 130p. <<http://upetd.up.ac.za/thesis/available/etd-02202009-0124/unrestricted/dissertation.pdf>> Accessed Nov. 14, 2010.
- De Vos A.J., De Waal D.T. & Jackson L.A. 2004. Bovine babesiosis, p.406-424. In: Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. Vol.1. Oxford University Press, Cape Town.
- Dreyer K., Foure L.J. & Kok D.J. 1998. Epidemiology of tick-borne diseases of cattle in Botshabelo and Thaba Nchu in the Free State Province. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 65(4):285-289.
- Frey A., Canzio J.D. & Zurakowski D. 1998. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J. Immunol. Methods* 221(1/2):35-41.
- González J.C. 1974. *O carrapato do boi: vida, resistência e controle*. Mestre Lou, São Paulo. 101p.
- Inam.2010. Instituto Nacional de Meteorologia de Moçambique. Disponível em: <http://www.inam.gov.mz>. Acesso em: 24 de novembro de 2010
- Jonsson N.N., Bock R.E. & Jorgensen W.K. 2008. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet. Parasitol.* 155(1/2):1-9.
- Levy M.G., Clabaugh G. & Ristic M. 1982. Age resistance in bovine babesiosis: Role of blood factors in resistance to *Babesia bovis*. *Infect. Immun.* 37(3):1127-1131.
- Madruga R.C., Marques A.P.C., Araujo F.R., Miguita M., Carvalho C.M.E. & Umaki A.C.S. 2001. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bigemina* in cattle and its application in an epidemiological survey in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 21(2):72-76.
- Madruga C.R., Aycardi E., Kessler R.M., Schenk M.A.M., Figueredo G.R. & Curvo J.B.E. 1984. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesq. Agropec. Bras.* 19:1163-1168.
- Martins T.M., Neves L., Pedro O.C., Fafetine J.M., Do Rosário V.E. & Domingos A. 2010. Molecular detection of *Babesia* spp. and other haemoparasitic infections of cattle in Maputo province, Mozambique. *Parasitol.* 137(6): 939-946.
- Martins T.M., Pedro O.C., Caldeira R.A., Do Rosário V.E., Neves L. & Domingos A. 2008. Detection of bovine babesiosis in Mozambique by a novel seminested hot-start PCR method. *Vet. Parasitol.* 153(3/4):225-230.
- Mahoney D.F. & Ross D.R. 1972. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.* 48(5):292-298.
- Mahoney D.F. 1975. The diagnosis of babesiosis in Australia, p.49-62. In: Wells E.A. (Ed.), *Workshop on Hemoparasites (Anaplasmosis and Babesiosis)*. CIAT, Cali, Colombia.
- Mbati P.A., Hlatshwayo M., Mtshali M.S., Mogaswane K.R., Waal T.D. & Dipeolu O.O. 2002. Ticks and tick-borne diseases of livestock belonging to resource-poor farmers in eastern Free State of South Africa. *Exp. Appl. Acarol.* 28(1/4):217-224.
- Mtshali M.S., De Waal D.T. & Mbati P.A. 2004. A sero-epidemiological survey of blood parasites in cattle in the north-eastern Free State, South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 71(1):67-75.
- Okuthe O.S. & Buyu G.E. 2006. Prevalence and incidence of tick-borne diseases in smallholder farming systems in the Western-Kenia highlands. *Vet. Parasitol.* 141(3-4):307-312.
- Simuunza M., Weir W., Courcier E., Tait A. & Shields B. 2010. Epidemiological analysis of tick-borne diseases in Zambia. *Vet. Parasitol.* 175(3/4):331-342.
- Soares C.O., Souza J.C.P., Madruga C.R., Madureira R.C., Massard C.L. & Fonseca A.H. 2000. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. *Pesq. Vet. Bras.* 20(2):75-79.
- TIA 2008. Trabalho de Inquérito Agrícola. Ministério da Agricultura de Moçambique, Maputo.
- Trindade H.L., Silva G.R.A., Teixeira M.C.A., Sousa M.G., Machado R.Z., Freitas E.L.C. & Almeida K.S. 2010. Detection of antibodies against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in calves from the region of Araguaína, State of Tocantins, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 19(3):169-173.

12 ANEXOS:

Anexo A

Protocolo para extração de DNA

Todos os procedimentos são realizados em temperatura ambiente.

- Descongelar e homogeneizar as amostras de sangue;
- Pipetar 200 µL de sangue em um tubo de micro centrífuga de 2 mL;
- Adicionar 30 µL de PROTEINASE K (20 mg/mL);
- Homogeneizar com pipeta e incubar a 65°C por 15 minutos em banho-maria;
- Remover o tubo de banho-maria acrescentar 300 µL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10% (C₁₂H₂₅NaO₄S) e homogeneizar a amostra por inversão e incubar a 65°C por 6 minutos em banho-maria;
- Adicionar 460 µL de clorofórmio e agitar em *vortex* vigorosamente. A porção líquida deve fluir livremente e a hemoglobina apresentar um aspecto de partículas cobertas de chocolate;
- Adicionar 240 µL da solução de precipitação protéica e homogeneizar em *vortex*, até a amostra tornar-se uniformemente viscosa;
- Centrifugar em velocidade máxima por 15 minutos;
- Pipetar a fase aquosa para um tubo de microcentrífuga de 2 mL;
- Adicionar 1 mL de etanol absoluto em temperatura gelada e homogeneizar por inversão até formar um precipitado, o qual deverá ser visto entre 30 e 60 segundos;
- Se o precipitado não for visualizado, esperar mais 10 minutos;
- Centrifugar em velocidade máxima por 5 minutos;
- Desprezar o sobrenadante e adicionar 1 mL de etanol 70% gelado;
- Centrifugar em velocidade máxima por 2 minutos;
- Desprezar novamente o sobrenadante. Centrifugar em velocidade máxima por 1 minuto;
- Remover resíduos de etanol com o auxílio de uma pipeta e inverter os tubos para secagem;
- Adicionar 100-150 µL de água ultrapura ou tris-EDTA para cada tubo e homogeneizar levemente com pipeta;
- Incubar a 65°C por 5 minutos em banho-maria;
- Acondicionar em freezer até a realização dos testes.

Reagentes para preparar soluções para extração de DNA

Acetato de potássio 5M

- Pesar 4.9 gramas de potássio
- Completar o volume com água destilada para volume final de 10 mL

Solução de precipitação protéica

- 6 mL de acetato de potássio 5M
- 1.1 mL de ácido acético glacial
- 2.9 mL de água destilada

Solução dodecil de sódio a 10%

- Pesar 4 gramas de SDS a 10%

Adicionar 40 mL de água destilada

Referência bibliográfica

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, vol. I. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

