



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VANESSA THARIN KRZYONOSKI HOLSBACH

**PREVALÊNCIA DE HEMOPARASITAS EM BOVINOS
LEITEIROS NO MUNICÍPIO DE TOLEDO, PARANÁ, BRASIL**

Londrina
2017

VANESSA THARIN KRZYONOSKI HOLSBACH

**PREVALÊNCIA DE HEMOPARASITAS EM BOVINOS
LEITEIROS NO MUNICÍPIO DE TOLEDO, PARANÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração - Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Felipe da Costa
Vieira

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Holsbach, Vanessa Tharin Krzyonoski.

Prevalência de hemoparasitas em bovinos leiteiros no município de Toledo, Paraná, Brasil / Vanessa Tharin Krzyonoski Holsbach. - Londrina, 2017.
60 f. : il.

Orientador: Odilon Vidotto.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Bovino de leite - Doenças - Tese. 2. Anaplasmos - Tese. 3. Babesiose em bovino - Tese. 4. Micoplasmose em animais - Tese. I. Vidotto, Odilon. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

VANESSA THARIN KRZYONOSKI HOLSBACH

**PREVALÊNCIA DE HEMOPARASITAS EM BOVINOS LEITEIROS NO
MUNICÍPIO DE TOLEDO, PARANÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração - Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Odilon Vidotto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Dauton Luiz Zulpo
Pontifícia Universidade Católica do Paraná -
PUCPR – Toledo

Prof. Dr. João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 10 de abril de 2017.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Protozoologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina sob orientação do Prof. Dr. Odilon Vidotto.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa relacionados abaixo:

1. CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
2. FAP/PR – Fundação Araucária

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família por estar sempre ao meu lado em todas as etapas percorridas até aqui, me orientado e sendo essenciais na minha jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Odilon Vidotto, pela oportunidade que me deu de fazer parte de sua equipe e pelo seu exemplo profissional.

Ao meu querido e eterno Prof. Dr. Dauton Luiz Zulpo, pelos ensinamentos acadêmicos, pessoais e pela sua amizade.

Aos meus fiéis amigos da residência, Carolina Lazarotto, Caroline Hoscheid, Lucas Ludwig e Thais Pagliuca pelo apoio, disposição e carinho cultivados durante os dois anos de convivência, que renderam essas amizades para a vida toda.

A minha amiga Samanta Melo, que mesmo distante sempre se faz presente em todos os momentos, me ouvindo e ajudando na escolha das decisões.

As minhas amigas Camila Rosa, Ediane Zanin, Francine Giotto e Melca Altoé, que foram minhas irmãs durante o mestrado e sempre estarão no meu coração.

Aos colegas dos Laboratórios de Protozoologia, Parasitologia e Helminologia Veterinária da UEL, pelo apoio e amizade.

HOLSBACH, Vanessa Tharin Krzyonoski. **Prevalência de hemoparasitas em bovinos leiteiros no município de Toledo, Paraná, Brasil**. 2017. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2017.

RESUMO

Prejuízos econômicos na produção de rebanhos bovinos podem ocorrer devido a alguns fatores, entre eles as hemoparasitoses, que são responsáveis por diminuição da produtividade dos animais e até mesmo a morte. A anaplasmose, babesiose e micoplasmose bovina são ocasionadas por microrganismos que possuem a capacidade de parasitar os eritrócitos e causar alterações que desencadeiam a morte dessas células, acarretando principalmente em anemia, febre, perda de peso e diminuição da produção. Devido a inespecificidade dos sinais clínicos, é preciso que o diagnóstico seja confirmado com exames laboratoriais e a técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR) possibilita a identificação de animais positivos. O presente trabalho teve como objetivo a detecção molecular de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Mycoplasma wenyonii* e 'Candidatus Mycoplasma haemobos' em bovinos leiteiros do município de Toledo, localizado na região Oeste do Paraná. Foram coletadas 376 amostras de sangue de vacas leiteiras, as quais foram submetidas à PCR para amplificação dos genes dos patógenos. Do total de amostras, 59,6% (224/376) foram positivas para *A. marginale*, 17,6% (66/376) positivas para *B. bigemina*, 24,2% (91/376) positivas para *B. bovis*, 17,8% (67/376) positivas para *M. wenyonii* e 12% (45/376) positivas para 'C. M. haemobos'. Os resultados mostraram animais com coinfeccção com dois ou mais patógenos, 2,9% (11/376) deles foram positivos para os cinco microrganismos pesquisados. Das 53 propriedades estudadas, 96,2% (51/53) foram positivas para *A. marginale*, 43,4% (23/53) positivas para *B. bigemina*, 73,6% (39/53) positivas para *B. bovis*, 51% (27/53) positivas para *M. wenyonii* e 41,5% (22/53) positivas para 'C. M. haemobos'. De acordo com os resultados encontrados no presente estudo, conclui-se que os agentes pesquisados estão distribuídos de forma heterogênea entre os animais da área estudada. As taxas de animais positivos oscilaram entre 12,0% e 59,6%, o que evidencia uma condição de instabilidade enzoótica, com alto risco de infecções para uma parcela significativa de animais susceptíveis. Esta situação sinaliza para a necessidade da diagnóstico e controle desses patógenos nos rebanhos estudados.

Palavras chave: Anaplasmose. Babesiose. Micoplasmose. Bovinocultura leiteira. PCR.

HOLSBACH, Vanessa Tharin Krzyonoski. **Prevalence of hemoparasites in dairy cattle of Toledo municipality, Paraná state, Brazil.** 2017. 60 p. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2017.

ABSTRACT

Economic losses in the production of cattle can occur due to some factors, among them the hemoparasitoses, that are responsible for decrease of the productivity of the animals and even the death. Anaplasmosis, babesiosis and bovine mycoplasmosis are caused by microorganisms that have the capacity to parasite erythrocytes and cause changes that trigger the death of these cells, taking mainly to anemia, fever, weight loss and decreased production. Due to the lack of specificity of the clinical signs, the diagnosis must be confirmed with laboratory tests and the polymerase chain reaction (PCR) technique allows the identification of positive animals. The present study aimed at the molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Mycoplasma wenyonii* and 'Candidatus Mycoplasma haemobos' in dairy cattle of Toledo municipality, localized in the west region of Paraná state. A total of 376 blood samples of dairy cows were collected, which were submitted to PCR of pathogen genes. Of the total samples, 59,6% (224/376) were positive for *A. marginale*, 17,6% (66/376) positive for *B. bigemina*, 24,2% (91/376) positive for *B. bovis*, 17,8% (67/376) positive for *M. wenyonii* and 12% (45/376) positive for 'C. M. haemobos'. The results showed animals with coinfection with two or more pathogens, 2,9% (11/376) of them were positive for the five microorganisms studied. Of the 53 studied farms, 96,2% (51/53) were positive for *A. marginale*, 43,4% (23/53) positive for *B. bigemina*, 73,6% (39/53) positive for *B. bovis*, 51% (27/53) positive for *M. wenyonii* and 41,5% (22/53) positive for 'C. M. haemobos'. According to the results found in the present study, it can be concluded that the agents studied are heterogeneously distributed among the animals of the region. Positive animal rates ranged from 12,0% to 59,6%, which shows a condition of enzootic instability, with a high risk of infections for a significant portion of susceptible animals. This situation indicates the need for the diagnosis and control of these pathogens in the herds studied.

Key words: Anaplasmosis. Babesiosis. Mycoplasmosis. Dairy cattle. PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Ciclo de vida da <i>Anaplasma marginale</i>	15
Figura 2-	Esfregaço sanguíneo contendo corpúsculos intraeritrocitários de <i>Anaplasma marginale</i>	17
Figura 3 -	Ciclo de vida da <i>Babesia</i> spp.	22
Figura 4 -	Estágio sanguíneo da <i>Babesia bovis</i> durante cultivo <i>in vitro</i>	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sequência de nucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de <i>A. marginale</i> , <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , Hemoplasmas, <i>M. wenyonii</i> e 'C. M. haemobos' pela reação em cadeia da polimerase (PCR).....	55
Tabela 2.	Ocorrências de infecções simples e coinfeções detectadas pela PCR de sangue de vacas colhidos entre outubro de 2013 a dezembro de 2014 no município de Toledo, Paraná, Brasil.....	56
Tabela 3.	Associação de vacas positivas para os agentes <i>A. marginale</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>B. bovis</i> , 'C. M. haemobos' e <i>M. wenyonii</i> com as variáveis raça e sistema de criação, avaliadas por PCR em 376 amostras de sangue colhidos entre outubro de 2013 a dezembro de 2014 no município de Toledo, Paraná, Brasil.....	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA – HEMOPARASIToses EM BOVINOS	13
2.1	ANAPLASMose BOVINA.....	13
2.1.1	Introdução e epidemiologia	13
2.1.2	Transmissão	13
2.1.3	Ciclo biológico	15
2.1.4	Sinais clínicos e patogenia	16
2.1.5	Diagnóstico.....	16
2.1.6	Tratamento	17
2.1.7	Controle e prevenção	18
2.2	BABESIOSE BOVINA	18
2.2.1	Introdução e epidemiologia	19
2.2.2	Transmissão	20
2.2.3	Ciclo biológico	20
2.2.4	Sinais clínicos e patogenia	23
2.2.5	Diagnóstico.....	23
2.2.6	Tratamento	25
2.2.7	Controle e prevenção	25
2.3	MICOPLASMose BOVINA.....	26
2.3.1	Introdução e epidemiologia	26
2.3.2	Ciclo biológico	27
2.3.3	Transmissão	27
2.3.4	Sinais clínicos e patogenia	28
2.3.5	Diagnóstico.....	29
2.3.6	Tratamento	29
2.3.7	Controle e prevenção	30
2.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
3	REFERÊNCIAS	31

4	OBJETIVOS	38
4.1	OBJETIVO GERAL.....	38
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	40
5.1	INTRODUÇÃO	43
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	44
5.2.1	Amostras	44
5.2.2	Extração de DNA e PCR	45
5.2.3	Análise estatística.....	45
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.4	CONCLUSÕES	50
5.6	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE	58

1 INTRODUÇÃO

O estado do Paraná ocupa o terceiro lugar no ranking dos maiores produtores de leite no Brasil, totalizando 3,9 bilhões de litros de leite por ano. Dos 110.000 produtores paranaenses, 86% possuem produção de até 250 litros por dia, sendo classificados como pequenos produtores. O principal desafio da atividade leiteira é aumentar a produtividade e a renda desses produtores, que geralmente possuem o leite como principal fonte de renda (EMATER, 2016).

O município de Toledo, localizado no Oeste do Paraná possui rebanho com 19.500 bovinos leiteiros, é o terceiro maior produtor de leite do estado (TOLEDO, 2015) com produção de 96 milhões de litros de leite por ano (HUNHOFF, 2016).

As hemoparasitoses presentes no rebanho bovino são responsáveis por grande perda na produção desses animais, caracterizando a importância de identificar e monitorar os bovinos portadores persistentemente infectados que vão para áreas livres da doença e para prevenir a infecção de animais suscetíveis (GIROTTI, 2012).

Os bovinos estão expostos a uma ampla variedade de agentes infecciosos, entre eles encontramos *Anaplasma marginale* e *A. centrale*, bactérias intraeritrocitárias que causam a anaplasmoze bovina (MARANA et al., 2009), doença de distribuição cosmopolita, que possui como vetores o *Rhipicephalus microplus*, *Haematobia irritans* e *Stomoxys calcitrans* (SILVA et al., 2014), mas também pode ser transmitida por fômites (KOCAN et al., 2010) e por via transplacentária (GRAU et al., 2013). A anaplasmoze resulta em anemia, perda de peso, diminuição da produção de carne e leite, aborto e em casos mais graves, a morte do animal (KOCAN et al., 2003).

Babesia bovis e *Babesia bigemina* também são importantes agentes infecciosos, esses protozoários parasitam eritrócitos de animais vertebrados (HOMER et al., 2000) e são responsáveis pela babesiose bovina (PENA, 2009), enfermidade que apresenta sinais clínicos como anemia, febre, icterícia, hemoglobinúria e em casos mais graves o óbito do animal (QIN et al., 2015). Como consequência dos sinais clínicos ocorre diminuição de produção do animal e perda financeira do produtor (MOSQUEDA et al., 2012).

Em território brasileiro o *R. microplus* é único vetor biológico desses protozoários (JULIANO et al., 2007), mas a transmissão também pode ocorrer de forma congênita ou por transfusão sanguínea. Um fator muito preocupante da babesiose é sua capacidade zoonótica (MASSARD; FONSECA, 2004) onde o ser humano possui papel de hospedeiro acidental do parasita (KAVANAUGH; DECKER, 2012; MOSQUEDA et al., 2004).

Mycoplasma wenyonii e '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' são agentes causais da micoplasmose bovina (SASAOKA et al., 2015), essas bactérias também são conhecidas como hemoplasmas e são encontradas aderidas a superfície dos eritrócitos (TAGAWA; MATSUMOTO; INOKUMA, 2008). Os hemoplasmas provocam hemólise dos eritrócitos, desencadeando anemia (SASAOKA et al., 2012) perda de peso, febre, depressão, diarreia (FARD; VAHEDI; MOHAMMADKHAN, 2014), queda na produção leiteira, infertilidade, edema escrotal e do úbere (GENOVA et al., 2011; GLADDEN et al., 2016; MARTÍNEZ-OCAMPO et al., 2016).

Até o momento a única forma de transmissão comprovada dos hemoplasmas foi a via transplacentária (HORNOK et al., 2011), mas sugere-se que carrapatos, insetos hematófagos e o contato direto com o sangue do animal acometido sejam fontes de transmissão (FARD; VAHEDI; MOHAMMADKHAN, 2014; TAGAWA; MATSUMOTO; INOKUMA, 2008).

O controle e prevenção dessas enfermidades deve ser preconizado, para isso é necessário controlar a população de carrapatos (COELHO; ANGRIMANI; MARQUES, 2011) insetos hematófagos (GONÇALVES, 2000) e deve-se evitar que sejam utilizados fômites (KOCAN et al., 2010; TAVAREZ, 2007).

2 REVISÃO DE LITERATURA – HEMOPARASITOSE EM BOVINOS

2.1 ANAPLASMOSE BOVINA

2.1.1 Introdução e epidemiologia

A *Anaplasma marginale* é uma bactéria pertencente a Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae (KOCAN et al., 2003), o primeiro relato desse microrganismo foi realizado por Theiler (1910). Atualmente esse é o patógeno que possui a maior frequência de transmissão por carrapatos no mundo, sendo responsável por alta morbidade e mortalidade em bovinos. O carrapato *Rhipicephalus microplus* e as moscas *Haematobia irritans* e *Stomoxys calcitrans* são considerados vetores desse agente (SILVA et al., 2014).

Esse patógeno ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e em zonas de clima temperado (SOUZA et al., 2001), nas áreas endêmicas para anaplasnose, medidas de controle contribuem na diminuição da ocorrência de casos clínicos e mortalidade dos animais devido à doença aguda (RIBEIRO et al., 2003).

Os bezerros infectados são mais resistentes que os adultos por apresentarem anticorpos maternos adquiridos através do colostro, que são responsáveis pela imunidade parcial do bezerro. Esse fator explica a parasitemia e anemia mais acentuadas em bovinos mais velhos e susceptíveis quando comparado a bezerros (GONÇALVES, 2000).

2.1.2 Transmissão

Anaplasma marginale pode ser transmitida de forma biológica, mecânica e transplacentária em bovinos. A transmissão biológica pelos carrapatos é o meio de propagação mais eficiente devido à replicação e persistência do agente no seu interior (SILVA, 2012). Mundialmente, pelo menos 20 espécies diferentes de ixodídeos foram reconhecidas como vetores biológicos na transmissão, os principais vetores incluem *Boophilus* spp., *Rhipicephalus* spp., *Ixodes ricinus* e algumas espécies de *Dermacentor* spp. (KOCAN et al., 2004). Os ixodídeos podem se infectar tanto durante o repasto sanguíneo em um animal com infecção aguda ou

crônica, quando há baixos níveis de parasitemia por *A. marginale* (SCOLES et al., 2005).

Na fase aguda, a probabilidade de o carrapato adquirir a *A. marginale* é de 95 a 100%, diminuindo para 27% a 84% na fase crônica (ERIKS; STILLER; PALMER, 1993).

A transmissão biológica pode ocorrer na forma transestadial (a partir de um estágio para outro do carrapato - ninfa e adulto) e forma intraestadial (dentro da mesma fase, ocorre quando o macho adulto se infecta em um bovino portador e posteriormente transmite para outro bovino), sendo a transmissão intraestadial da *A. marginale* a mais provável de ocorrer, pois quando os machos adultos procuram fêmeas para acasalar, alimentam-se em vários animais (ZAUGG et al., 1986).

Estudos comprovaram que insetos hematófagos como moscas (*Stomoxys calcitrans*), oito espécies de tabanídeos (família Tabanidae) e três espécies de *Culicoides* (família Ceratopogonidae) possuem potencial de transmissão mecânica da *A. marginale*. Para ocorrer transmissão da *A. marginale*, o inseto hematófago precisa se alimentar do sangue de um bovino infectado, contaminar os aparelhos bucais com eritrócitos e picar um outro bovino antes de ocorrer desidratação dos eritrócitos com o agente (SILVA, 2012). Os tabanídeos têm um papel importante na transmissão da *A. marginale*, pois deslocam-se por grandes distâncias, têm com frequência a sua alimentação interrompida e possuem grandes peças bucais que são facilmente contaminadas (FOIL, 1989).

Poucos trabalhos demonstram a presença de *Anaplasma* spp. em piolhos e apenas relatam a detecção de ácido desoxirribonucleico (DNA) do patógeno, o que não garante que os piolhos sejam vetores competentes (AUBRY; GEALE 2011), já a disseminação iatrogênica (por objetos com sangue infectado) representa uma importante forma de transmissão de *A. marginale* (KOCAN; BLOUIN; BARBET, 2000).

A transmissão transplacentária tem sido relatada com certa frequência e na maioria dos casos os fetos foram infectados quando a vaca foi infectada durante o período de gestação. Alguns casos sugerem que a transmissão intrauterina ou transplacentária pode ocorrer em vacas portadoras crônicas. Com isso, pode-se concluir que a transmissão transplacentária de *A. marginale* pode ser importante para a epidemiologia da anaplasnose (KOCAN et al., 2003).

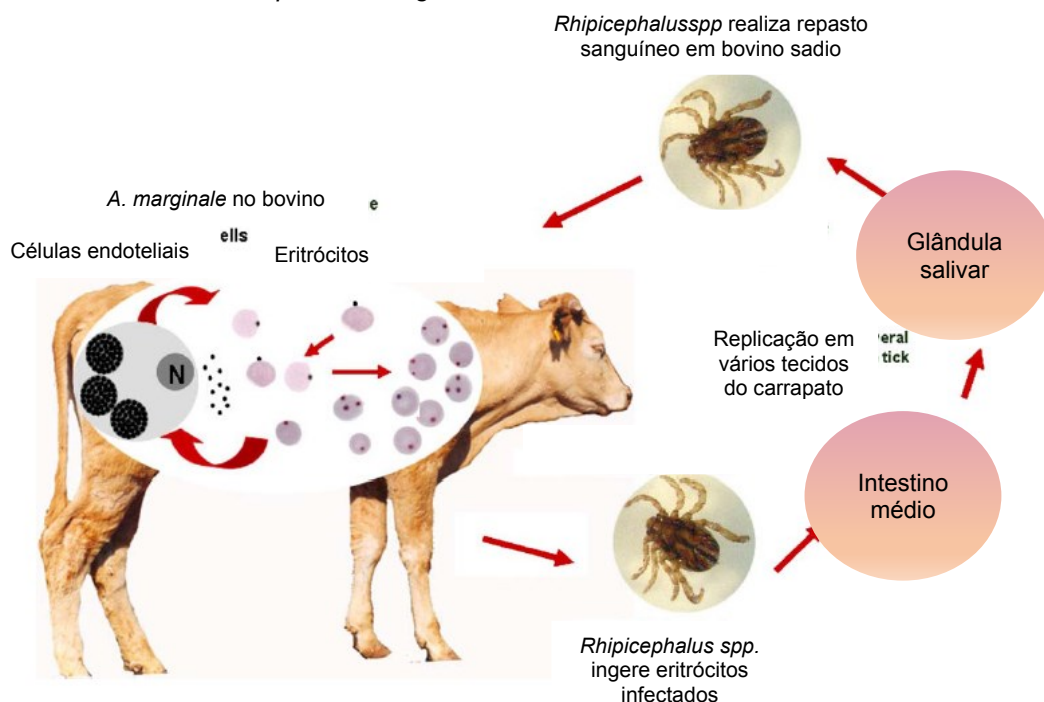
2.1.3 Ciclo biológico

Ao se alimentar do sangue de um animal infectado pela *Anaplasma* spp. o carrapato se torna um vetor desse agente e ao realizar o repasto sanguíneo em um animal sadio, transfere para este o patógeno através da saliva (LABRUNA, 2010).

Quando o carrapato se torna infectado com *A. marginale*, primeiramente são observadas formas vegetativas ou reticuladas da bactéria nas células epiteliais do intestino, estas formas se replicam por divisão binária e podem viver um período curto fora das células, como no momento em que vão para a saliva do carrapato até o repasto sanguíneo (RODRÍGUEZ et al., 2009).

Durante repasto sanguíneo, o agente entra na corrente sanguínea, se adere a parede dos eritrócitos do bovino (únicas células parasitadas no hospedeiro vertebrado) e os invade através da invaginação pela membrana plasmática (GIARDINA, 1983). No interior do eritrócito o parasita se reproduz por divisão binária, causa alterações na densidade citoplasmática e induz a formação de poros na parede da membrana da célula, através do qual a *Anaplasma* sai do eritrócito sem causar lise deste, e invade outro eritrócito, dando continuidade ao seu ciclo (Figura 1) (O'DWYER, 2012).

Figura 1- Ciclo de vida da *Anaplasma marginale*.



Fonte: Adaptado de RODRÍGUEZ et al., 2009.

2.1.4 Sinais clínicos e patogenia

O período de incubação (PI) dessa rickettsia depende da cepa e dose infectante, variando assim de 18 a 40 dias. Após o PI, o número de eritrócitos parasitados aumenta. Com o objetivo de combater a infecção o sistema imunológico do hospedeiro realiza a opsonização das hemácias infectadas, gerando assim a fagocitose destas pelos macrófagos (principalmente os macrófagos do baço), ocasionando anemia hemolítica e icterícia (MADRUGA et al., 2001; COELHO, 2007).

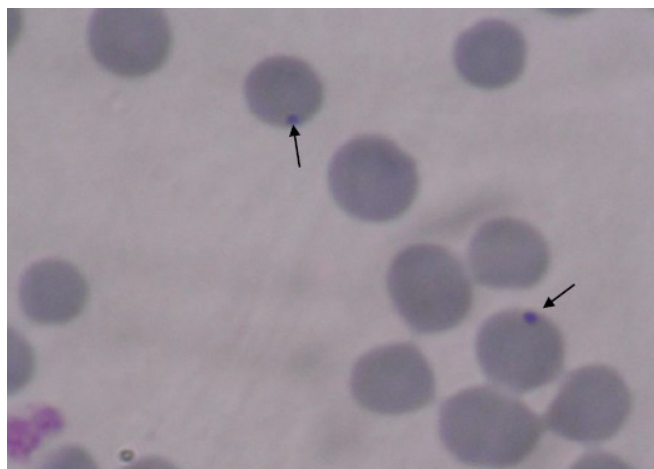
A medida que a parasitemia aumenta, os sinais de febre, apatia, taquipnéia, taquicardia e mucosas ictéricas são mais intensos. Pode-se observar monocitose, indicando um mecanismo compensatório devido ao aumento da demanda de monócitos para combater o patógeno. Lacrimejamento, sialorreia, micção frequente, perda de peso, aborto e morte também fazem parte dos sinais clínicos. A anaplasnose provoca sinais clínicos graves decorrentes da anemia acentuada e redução das proteínas plasmáticas, porém não possui patogenicidade suficiente para causar lesão hepática ou renal (VIDOTTO et al., 2006; BERNARDI; KEMMERICH; FRANCISCATO, 2014; ALBERTON et al., 2015).

2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico pode ser realizado com base no histórico do animal, sinais clínicos e exames laboratoriais. É importante que se faça a confirmação perante testes laboratoriais, pois os sinais clínicos da doença são inespecíficos. Existem vários testes com diferentes sensibilidades e especificidades, o que pode dificultar na escolha do exame mais adequado (MARQUES, 2003; BACANELLI; RAMOS; ARAÚJO, 2014).

Esfregaços sanguíneos (Figura 3) de animais na fase aguda, corados com corantes do tipo Romanowsky e modificações deste (Giemsa, Leishman, Wrigth e Panótico), são de grande importância para confirmação do diagnóstico clínico (BOCK et al., 2004; KOCAN et al., 2010), sendo um dos principais métodos de diagnóstico, pois apresenta praticidade e baixo custo. Em bovinos cronicamente infectados essa técnica apresenta baixa sensibilidade devido ao baixo número de hemácias infectadas (BÖSE et al., 1995; COSTA JUNIOR et al., 2006).

Figura 2- Esfregaço sanguíneo contendo corpúsculos intraeritrocitários de *Anaplasma marginale*.



Fonte: SOUZA, 2011.

Dentre os testes sorológicos, as técnicas mais rotineiramente empregadas são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) (O'DWYER, 2010; SOUZA et al., 2013).

A elaboração de técnicas de diagnóstico molecular possibilitou a realização de exames com alta especificidade e sensibilidade. Atualmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), é bastante utilizada na investigação de agentes etiológicos, pois mesmo com baixa parasitemia possui sensibilidade aproximadamente 100 vezes maior que a técnica de esfregaço sanguíneo (O'DWYER, 2010). Quando utilizada a técnica de nested PCR (nPCR) essa sensibilidade pode ser ainda maior (SOUZA et al., 2013).

2.1.6 Tratamento

O tratamento é feito à base de antibióticos como a tetraciclina ou oxitetraciclina (2 a 4 mg/kg) pela via intramuscular com 2 a 4 aplicações em intervalos de 21 dias (GONÇALVES, 2000).

Segundo Alberton et al. (2015), pode-se utilizar dipropionato de imidocarb a 1% (dose única de 2,5mg/kg de peso vivo, por via subcutânea), enrofloxacina a 10% (dose de 5mg/kg de peso vivo, por via intramuscular, uma vez ao dia, durante sete dias) e oxitetraciclina de longa ação a 20% (em três doses de 20mg/kg, por via intramuscular, a cada 48 horas). A enrofloxacina apresenta resposta mais rápida

quando comparada as outras duas drogas nos primeiros cinco dias de tratamento, porém após o término do tratamento o imidocarb e a oxitetracilina tendem em diminuir a prevalência de animais positivos.

Mesmo passando pelo tratamento, os animais podem se tornar portadores crônicos da enfermidade e não existem evidências de que não ocorra a reinfeção (FELSHEIM et al., 2010).

2.1.7 Controle e prevenção

Desde a descoberta da anaplasnose já ocorreram muitos avanços em relação ao estudo da genética, imunologia e da patologia do seu agente infeccioso, mas a prevenção dessa enfermidade ainda é baseada nas vacinas vivas atenuadas, quimioprofilaxia e promoção da estabilidade enzoótica dos rebanhos bovinos (GASPARINI et al., 2013). Deve-se realizar o controle de artrópodes por aplicação de acaricidas, administração profilática de antibióticos e medidas de manejo que evitem a transmissão por fômites (KOCAN et al., 2010).

A imunização de animais suscetíveis em conjunto com o controle de carrapatos pode ser utilizada como medida de profilaxia em determinadas áreas de instabilidade enzoótica. O controle de moscas também deve ser realizado, principalmente em épocas de chuva (pois a população de dípteros hematófagos aumenta) controlando assim as taxas de infecção pela *A. marginale* (GONÇALVES, 2000).

O começo da utilização de vacinas vivas para o controle da anaplasnose se deu no início de 1900 (THEILER, 1911), a cepa *da A. centrale* confere imunidade parcial contra *A. marginale* (VIDOTTO, 2008), até hoje a vacinação é realizada em alguns países, pois os animais vacinados desenvolvem infecções persistentes, induzindo assim a imunidade protetora ao longo da vida. Em algumas regiões como Israel, Austrália, América do Sul e África a *Anaplasma centrale* é utilizada como vacina viva, mas a infecção com este microrganismo pode em certas ocasiões causar a doença clínica (KOCAN et al., 2003).

2.2 BABESIOSE BOVINA

2.2.1 Introdução e epidemiologia

Dentro do filo Apicomplexa, Ordem Piroplasmorida, Família Babesidae encontram-se os parasitas do gênero *Babesia*, protozoários que possuem a capacidade de infectar várias espécies de animais, inclusive o homem, desencadeando uma doença conhecida como babesiose. A descoberta da babesiose bovina foi feita por Viktor Babes em 1888, na Romênia, quando o mesmo verificou a presença de corpos piriformes no interior das hemácias de bovinos. Cinco anos depois, Smith e Kilborne (1893) relataram pela primeira vez a *Babesia bigemina* (MOSQUEDA et al., 2012; MOURA et al., 2003).

Babesia spp. parasitam somente eritrócitos de animais vertebrados (FRIEDHOFF, 1988) e os animais infectados apresentam anemia, febre, icterícia, hemoglobinúria e, em casos mais graves, pode ocorrer o óbito. Bovinos que sobrevivem a essa enfermidade tornam-se reservatórios naturais da doença (QIN et al., 2015).

Grande número de bovinos de regiões tropicais e subtropicais são expostos ao risco de infecção pela babesiose, sendo de importância econômica inquestionável devido a alta morbidade e mortalidade nos bovinos primo-infectados (SOLORIO-RIVERA; RODRIGUEZ-VIVAS, 1997).

No Brasil a babesiose bovina é ocasionada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, o carrapato *Rhipicephalus microplus* é o único vetor biológico desses agentes (JULIANO et al., 2007). Segundo Amorim et al. (2014), o perfil epidemiológico dessa doença varia de acordo com raça, idade, clima, estresse e manejo de pastagens. Algumas áreas são livres de babesiose por apresentarem condições desfavoráveis para o desenvolvimento do vetor, as áreas instáveis são onde as condições climáticas ou manejo dos animais acarretam no aparecimento da enfermidade em alguns períodos do ano, já nas áreas estáveis, a doença ocorre ao longo do ano, conferindo altos títulos de anticorpos nos animais, promovendo assim a proteção dos bezerros nos primeiros meses de vida através da ingestão do colostro.

Outro fator importante do estudo da babesiose é seu potencial zoonótico, relatos de diversos casos de infecção humana podem ser encontrados na literatura (MASSARD; FONSECA, 2004).

A anaplasmoze e babesiose juntas são responsáveis pela tristeza parasitária bovina (TPB), no território brasileiro a *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e a *B. bigemina* são os agentes etiológicos da TPB. Esse complexo de doenças limita o desenvolvimento da pecuária devido a perdas através da redução da produção dos animais, infertilidade temporária, tratamento e mortalidade dos animais (GONÇALVES, 2000).

2.2.2 Transmissão

Babesia spp. são protozoários intraeritrocitários que podem ser transmitidos aos bovinos através da picada do *Rhipicephalus microplus*, sendo as larvas do carrapato responsáveis por transmitir a *Babesia bovis* e as ninfas e adultos a *Babesia bigemina*. Nos bovinos a transmissão também pode ser congênita ou por transfusão sanguínea e nos carrapatos ocorre a transmissão transovariana. No ciclo de vida da *Babesia* o ser humano não possui papel de reservatório da enfermidade, mas sim de hospedeiro acidental (KAVANAUGH; DECKER, 2012; MOSQUEDA et al., 2004).

Babesia bovis ocasiona doença aguda e persistente em bovinos, os animais que sobrevivem a essa fase tornam-se portadores persistentemente infectados, sendo fonte de transmissão do agente através do carrapato vetor (LAUGHERY et al., 2014).

2.2.3 Ciclo biológico

Os bovinos são infectados através do repasto sanguíneo do *R. microplus*, que inocula saliva contendo esporozoítos na corrente sanguínea do animal, os esporozoítos penetram a membrana celular dos eritrócitos, sem rompe-los e se transformam em trofozoítos (MASATANI et al., 2016).

Através da divisão assexuada o trofozoíto gera dois merozoítos (podendo gerar quatro merozoítos), que permanecem interligados até seu amadurecimento. Após o amadurecimento dos merozoítos, estes se separam e rompem o eritrócito parasitado. A partir daí alguns merozoítos penetram em um eritrócito íntegro e posteriormente se transformam em trofozoítos, dando continuidade ao ciclo no

hospedeiro vertebrado e outros são ingeridos por carrapatos adultos durante o repasto sanguíneo (TRINDADE; ALMEIDA; FREITAS, 2011).

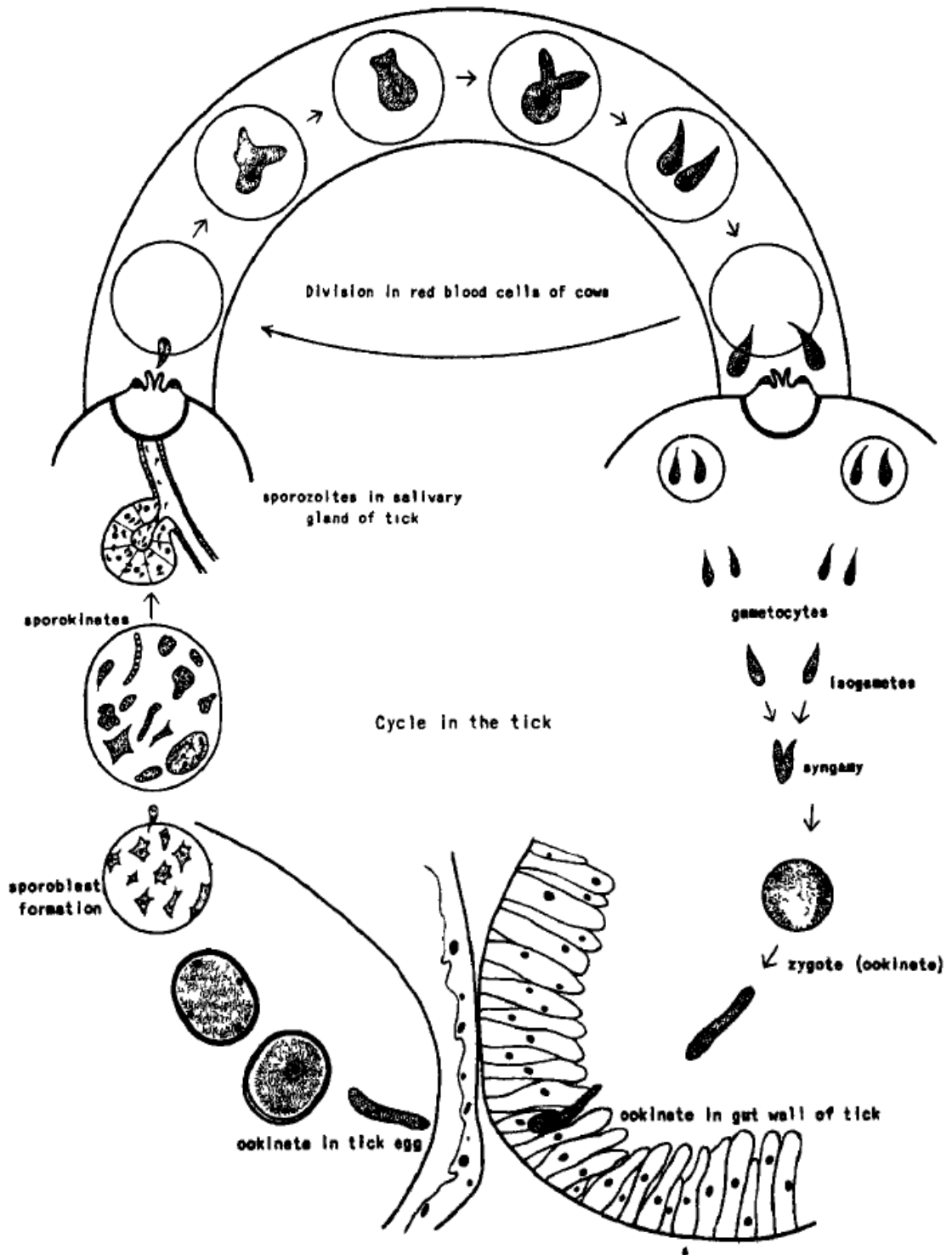
Os merozoítos ingeridos pelo carrapato são destruídos quando chegam no trato digestivo, apenas os gametócitos dão continuidade ao ciclo no hospedeiro invertebrado (O'DWYER, 2012).

Os gametócitos se transformam em gametas masculinos e femininos e se fundem, formando um zigoto (MOSQUEDA et al., 2012), que se transforma em oocineto, penetra células intestinais e através da divisão assexuada dá origem a esporocinetos. Os esporocinetos rompem as células intestinais do carrapato, vão para a hemolinfa e através dela distribuem-se para diferentes tipos de células e tecidos, incluindo o útero da fêmea. A transmissão transovariana ocorre devido a infecção das células embrionárias por esporocinetos (BOCK et al., 2004).

No momento em que as larvas infectadas realizam o repasto sanguíneo no bovino, os esporocinetos migram para a glândula salivar e através da reprodução assexuada geram esporozoítos infectantes, que junto a saliva do carrapato entram na corrente sanguínea do bovino (MARTINS; CORRÊA, 1995).

Os animais que se recuperam da infecção aguda se tornam portadores assintomáticos, pois as babesias persistem no sangue durante muitos anos. É possível também a ocorrência do reaparecimento de sinais clínicos da enfermidade (MASATANI et al., 2016).

Figura 3 - Ciclo de vida da *Babesia* spp.



Fonte: LEVINE, 1985.

2.2.4 Sinais clínicos e patogenia

Babesia bovis é considerada mais patogênica que a *Babesia bigemina*, o período de incubação de ambas varia de 7 a 20 dias e os sinais clínicos são decorrentes da multiplicação dos protozoários nos eritrócitos do bovino (SANTAROSA et al., 2013).

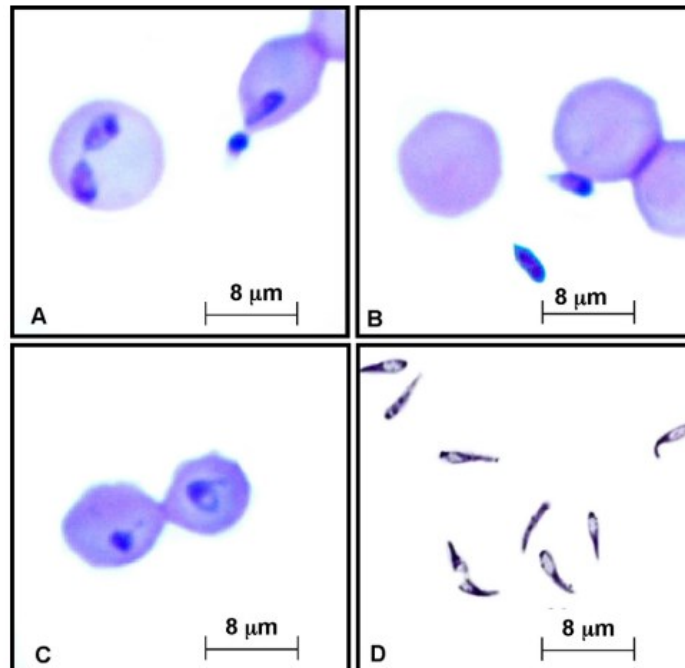
Devido a destruição intravascular dos eritrócitos os animais apresentam febre, depressão, icterícia, anorexia, taquicardia, taquipnéia, anemia, hemoglobinemia, hemoglobinúria e aborto. Em casos mais graves pode ocorrer a morte do animal devido a uma síndrome semelhante ao choque, associada com acúmulo de toxinas, liberação de substâncias vasoativas e anoxia anêmica (ZAUGG, 2006).

A *Babesia bovis* é a responsável pela babesiose cerebral, esse quadro se desenvolve devido ao sequestro de eritrócitos infectados na microcirculação do cérebro, que acarreta em anóxia cerebral e leva a hiperexcitabilidade, incoordenação motora, convulsões, opistótono, cegueira, coma e morte. Geralmente os casos cerebrais são fatais, mas podem variar de acordo com a suscetibilidade do hospedeiro, fatores ambientais e manejo (CÂMARA et al., 2009; ZAUGG, 2006).

2.2.5 Diagnóstico

O esfregaço sanguíneo é a técnica de escolha em casos agudos de babesiose e é preferível que seja realizado com sangue coletado da circulação periférica (margem da orelha ou ponta da cauda). Devido à pouca sensibilidade desse método de diagnóstico em baixas parasitemias, pode ser necessário a realização de exames mais sensíveis e específicos para o agente (CARVALHO; GUERRA, 2012; O'DWYER, 2010).

Figura 4 - Estágio sanguíneo da *Babesia bovis* durante cultivo *in vitro*.



(A) Merozoíto intracelular maduro de *B. bovis*. (B) Merozoíto livre de *B. bovis* e um merozoíto livre ligado a superfície do eritrócito bovino. (C) Trofozoíto intracelular de *B. bovis*. (D) Quinete de *B. bovis* isolados da hemolinfa de *Rhipicephalus microplus* infectados com *B. bovis*.

Fonte: SUAREZ; NOH, 2011.

Testes sorológicos podem ser realizados principalmente em estudos epidemiológicos, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) são os mais utilizados e possuem alta sensibilidade e especificidade (SANTOS et al., 2001). A vantagem do ELISA sobre a RIFI é a automação da leitura, o que torna possível realizar a técnica com maior número de amostras em menor intervalo de tempo (MADRUGA et al., 2000).

Técnicas moleculares vem sendo utilizadas em grande escala para o diagnóstico da enfermidade, a mais utilizada é a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) que possui elevada especificidade e sensibilidade (MTSHALI; MTSHALI, 2013).

2.2.6 Tratamento

Quanto mais cedo for realizado o diagnóstico da enfermidade e tratamento adequado do animal, maior a chance de recuperação. As drogas utilizadas são a base de diaminas e imidocarb, como por exemplo o diaceturato de diminazene (3 a 5 mg/kg), isetionato de fenamidina (8 a 13 mg/kg), isetionato de amicarbalida (5 a 10 mg/kg) e dipropionato de imidocarb (1 a 3 mg/kg). O imidocarb é utilizado com maior frequência devido ao seu efeito prolongado obtido pela sua lenta metabolização no organismo do animal, já as diamidinas possuem rápida ação. Além do tratamento específico é aconselhável que se realize o tratamento suporte em casos graves, este tratamento deve ser feito à base de transfusão sanguínea, fluídos e antibióticos profiláticos (O'DWYER, 2010; ZAUGG, 2006).

As *Babesia* spp. possuem diferentes graus de sensibilidade com relação as drogas preconizadas, se comparada a *Babesia bovis*, a *Babesia bigemina* é mais sensível a ação das drogas babesicidas, tendo assim melhores resultados frente ao tratamento. É necessário ressaltar que devido a fragilidade do animal em casos mais graves, como por exemplo na babesiose cerebral, é preciso evitar até mesmo movimentação brusca do animal, pois esta ação pode ser suficiente para ocasionar a morte do bovino (ALVES-BRANCO; BULCÃO; MUNHÓS, 1994).

2.2.7 Controle e prevenção

Tanto a quimioprofilaxia quanto a premunição são extremamente importantes de serem realizadas no controle da enfermidade, principalmente quando se pensa em introduzir no rebanho animais provenientes de áreas livres da doença. A quimioprofilaxia deve ser realizada com drogas específicas em doses subterapêuticas, o que permitirá que o animal adquira a infecção e apresente apenas sinais clínicos brandos, ou até mesmo nenhum sinal clínico. Já a premunição consiste na inoculação de sangue de um animal portador do agente infeccioso em animais suscetíveis, os animais que forem os receptores desse sangue precisam ser acompanhados e tratados caso ocorra a manifestação de sinais clínicos (O'DWYER, 2010).

Na estratégia para o controle da babesiose é necessário ainda que se faça o controle dos carrapatos vetores através do uso de acaricidas (MTSHALI; MTSHALI, 2013; LAUGHERY et al., 2014). Muitos antiparasitários foram retirados do mercado devido a problemas de segurança ou surgimento de resistência (MASATANI et al., 2016).

A vacina viva atenuada de cepas de *B. bovis* também pode fazer parte da estratégia de controle, a proteção ocorre devido a infecção persistente, que estimula continuamente o sistema imunitário do animal vacinado (LAUGHERY et al., 2014), porém mesmo com a vacinação a babesiose pode ocorrer devido a infecção do animal com isolados de campo heterólogos (MOLAD et al., 2015).

Nos Estados Unidos da América obteve-se a erradicação dos carrapatos vetores da babesiose através da implantação de um programa eficaz. Outros países também tentaram realizar essa erradicação, porém não foram bem sucedidos devido à fatores como resistência dos carrapatos aos acaricidas, habilidade dos carrapatos em infestar hospedeiros alternativos, falha em obter a cooperação de todos os pecuaristas e a ausência de fontes de financiamento com suporte a um programa prolongado de erradicação (ZAUGG, 2006).

2.3 MICOPLASMOSE BOVINA

2.3.1 Introdução e epidemiologia

A micoplasmose é ocasionada por micoplasmas hemotrópicos, também conhecidos como hemoplasmas, bactérias pleomórficas que geralmente apresentam formato arredondado, não possuem parede celular e são responsáveis pela causa de anemia em várias espécies de mamíferos (FARD; VAHEDI; MOHAMMADKHAN, 2014; MARTÍNEZ-OCAMPO et al., 2016).

Os hemoplasmas pertencem a classe Mollicutes, família Mycoplasmataceae e gênero *Mycoplasma* (SANTOS et al., 2014), Adler e Ellenbogen (1934) foram os primeiros a detectarem amostras infectadas com hemoplasma bovino, microrganismo que foi nomeado como *Eperythrozoon wenyonii*, pertencendo a ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae. Posteriormente, Neimark e Kocan (1997) estudaram sequências do gene 16S RNA ribossomal do *Eperythrozoon*

wenyonii e através das investigações filogenéticas detectaram que não havia relação filogenética com a *Rickettsia*, mas sim com os microrganismos pertencentes ao gênero *Mycoplasma*, o que acarretou na reclassificação da bactéria para este gênero e consequente modificação do nome do agente infeccioso para *Mycoplasma wenyonii* (NEIMARK et al., 2001) o qual se encontra distribuído mundialmente (TAGAWA; MATSUMOTO; INOKUMA, 2008).

O segundo hemoplasma bovino foi descoberto por Tagawa, Matsumoto, Inokuma (2008), que detectaram a presença do ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ em amostras de sangue de bovinos do Japão. Desde então somente houveram outros relatos da presença do parasita na Suíça (MELI et al., 2010), China (SU et al., 2010), Hungria (HORNOK et al., 2011), Alemanha (HOELZLE et al., 2011), Brasil (GIROTTTO et al., 2012), Inglaterra (AYLING et al., 2012) e mais recentemente na Nova Zelândia (MCFADDEN et al., 2016) e México (MARTÍNEZ-OCAMPO et al., 2016).

2.3.2 Ciclo biológico

Ainda não foram realizados estudos em que se obteve uma cultura celular de hemoplasmas e até o momento também não foram identificados os vetores responsáveis pela transmissão dos hemoplasmas, o que limita a investigação sobre a transmissão e ciclo de vida desses agentes infecciosos (GENOVA et al., 2011; WITTER et al., 2017).

2.3.3 Transmissão

Até o ano de 2010 não existia nenhuma comprovação sobre os meios de transmissão dos micoplasmas, haviam apenas evidência de que moscas, piolhos e pulgas poderiam servir de vetores para a transmissão mecânica, e carrapatos poderiam servir como vetores biológicos (MELI et al., 2010).

Em 2011 houve a primeira confirmação da transmissão via transplacentária de *M. wenyonii* e ‘*C. M. haemobos*’ em bovinos e nesse mesmo estudo detectou-se a presença desses hemoplasmas em dípteros hematófagos (HORNOK et al., 2011). Cinco anos após a descoberta da transmissão transplacentária, Girotto-Soares et al.

(2016) detectaram pela primeira vez a presença de ‘*C. M. haemobos*’ em fetos bovinos abortados no Brasil.

Apesar de ainda não estar comprovada outras vias de transmissão além da transplacentária, continua-se sugerindo que através de carrapatos, picada de insetos hematófagos, contato direto com o sangue do animal acometido (FARD; VAHEDI; MOHAMMADKHAN, 2014; TAGAWA; MATSUMOTO; INOKUMA, 2008) e a forma iatrogênica possam ser fontes de transmissão dos patógenos (GENOVA et al., 2011).

2.3.4 Sinais clínicos e patogenia

Os hemoplasmas são encontrados aderidos a superfície celular dos eritrócitos (TAGAWA; MATSUMOTO; INOKUMA, 2008) e livres no plasma (MARTÍNEZ-OCAMPO et al., 2016), por mais que não possuam a característica de adentrar nos eritrócitos (LABRUNA, 2010) acabam lesando a parede celular dos mesmos devido a mecanismos imunomediados e outros ainda não definidos (MESSICK, 2004), fazendo com que estes sejam removidos da circulação sanguínea para baço (RADOSTITS, 2007).

Apesar de a importância clínica do *Mycoplasma wenyonii* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ ainda serem controversas, acredita-se que causem na maioria das vezes a enfermidade na forma subclínica, raramente provocando doença clínica grave no bovino. Sugere-se ainda que a doença clínica se manifeste quando relacionada a presença de fatores debilitantes como a presença de coinfeções, que podem contribuir para a sua patogenicidade principalmente quando acarreta em imunossupressão (GLADDEN et al., 2016; RADOSTITS, 2007; TAGAWA; MATSUMOTO; INOKUMA, 2008). Os hemoplasmas podem participar como cofatores na progressão de doenças retrovirais, neoplásicas e imunomediadas (MESSICK, 2004).

Os bovinos infectados com *M. wenyonii* e com ‘*C. Mycoplasma haemobos*’ podem apresentar anemia, perda de peso, febre, linfadenopatia, depressão, queda na produção leiteira, infertilidade, edema escrotal e de úbere. Bezerros e animais esplenectomizados apresentam anemia clínica mais acentuada que os demais

(GENOVA et al., 2011; GLADDEN et al., 2016; MARTÍNEZ-OCAMPO et al., 2016; SASAOKA et al., 2013).

Mesmo com a ocorrência de uma resposta imune intensa e tratamento com antibiótico os animais infectados provavelmente permanecerão portadores crônicos mesmo após os sinais clínicos cessarem (MESSICK, 2004; RADOSTITS, 2007).

2.3.5 Diagnóstico

A investigação microbiológica de hemoplasmas tem sido dificultada devido a ainda não terem sido desenvolvidos meios apropriados para cultivá-los *in vitro*, sendo assim, o diagnóstico pode ser realizado com base em esfregaços de sangue, PCR, ELISA ou Western blot (SASAOKA et al., 2015).

Através do esfregaço sanguíneo corado com romanowski e giemsa é possível que se visualize os hemoplasmas, porém não é possível a diferenciação da espécie e muitas vezes é difícil confirmar a infecção, pois o microrganismo se assemelha aos corpúsculos de Howell-Jolly e resquícios de corante na lâmina (GENOVA et al., 2011; TAGAWA; MATSUMOTO; INOKUMA, 2008), outro fator negativo dessa técnica é sua baixa sensibilidade (NISHIZAWA et al., 2010).

Atualmente a reação em cadeia pela polimerase (PCR) através do gene 16S RNAr é o método mais sensível e específico para a detecção dos hemoplasmas (FARD; VAHEDI; MOHAMMADKHAN, 2014) e o mais utilizado (SASAOKA et al., 2015).

2.3.6 Tratamento

Os micoplasmas respondem bem ao tratamento com lincomicina, enrofloxacina, doxiciclina (FARD; VAHEDI; MOHAMMADKHAN, 2014) e tetraciclina, que reduzem a carga bacteriana e sinais clínicos da enfermidade. (GENOVA et al., 2011; MESSICK, 2004).

Segundo Genova et al. (2011) ainda não se obteve a comprovação de que um antibiótico tenha eliminado o agente e é possível que os animais infectados permaneçam como portadores durante toda sua vida.

2.3.7 Controle e prevenção

Devido a possibilidade de moscas, piolhos, pulgas, carrapatos e a forma iatrogênica poderem ser fontes de transmissão dos patógenos (MELI et al., 2010; HORNOK et al., 2011; GENOVA et al., 2011; FARD; VAHEDI; MOHAMMADKHAN, 2014) é preconizado o combate de ectoparasitas (COELHO; ANGRIMANI; MARQUES, 2011) e a prevenção da iatrogenese (TAVAREZ, 2007).

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças transmitidas por vetores são cada vez mais importantes, pois estes transmitem grande variedade de patógenos (HOFMANN-LEHMANN et al., 2004) inclusive os agentes causadores da anaplasmoze, babesiose e micoplasmoze bovina, enfermidades responsáveis por diminuição da produtividade dos bovinos e conseqüentemente prejuízos econômicos não só devido à baixa produtividade, mas também ao custo com medicamentos e óbito de alguns animais que desenvolvem quadro clínico mais acentuado (GLADDEN et al., 2016; MOSQUEDA et al., 2012; THEILER, 1910).

Um grande problema a ser enfrentado atualmente é resistência dos carrapatos as drogas utilizadas para seu combate (VITA et al., 2012). Existem ainda dificuldades associadas a aplicações de acaricidas que reforçam a necessidade de desenvolvimento de vacinas que além de controlar a infecção causada pelos patógenos também possa controlar as infestações de carrapatos, acarretando em redução da incidência das enfermidades (MERINO et al., 2011).

Para que surjam novas estratégias terapêuticas para essas enfermidades é necessária a realização de análises detalhadas dos mecanismos que são essenciais para a sobrevivência dos agentes no hospedeiro (MASATANI et al., 2016).

3 REFERÊNCIAS

- ABOYTES TORRES, R.; RODRÍGUEZ, S. D.; VEGA, C. A. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis. **Archives of Medical Research**, v.25, n.2, p. 247-252, 1994.
- ADLER, S., ELLENBONGEN, V. A note on two new blood parasites of cattle, *Eperythrozoon* and *Bartonella*. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v.47, p.219-221, 1934.
- ALBERTON, L. R. et al. Eficácia do dipropionato de imidocarb, da enrofloxacin e do cloridrato de oxitetraciclina no tratamento de bovinos naturalmente infectados por *Anaplasma marginale*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.4, p. 1056-1062, 2015.
- ALVES-BRANCO, F. P. J.; BULCÃO, J. L. F.; MUNHÓS, M. F. **Algumas normas de orientação para o tratamento da tristeza parasitária bovina**, 1994. 14p. Bagé, EMBRAPA – CPPSUL. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/225638/1/ALGUMASNORMASD E.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2016
- AMORIM, L. S. et al. Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, n.3, p.328-336, jul.-set. 2014.
- AUBRY, P.; GEALE, D. W. A review of bovine anaplasmosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, out. v.58, n.1, p. 1-30, 2011.
- AYLING, R. D. et al. Detection of ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’, *Mycoplasma wenyonii* and *Anaplasma phagocytophilum* from cattle in England. **Veterinary Record**, v.170, n.21, p.543a, 2012. 2012 (short communications).
- BACANELLI, G. M.; RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R. Molecular diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle: quantitative evaluation of a real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) based on *msp5* gene¹. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.1, p. 29-33, janeiro 2014.
- BERNARDOI, F. D.; KEMMERICH, C.; FRANCISCATO, C. *Anaplasma marginale*: alterações laboratoriais causadas em bovinos. In: Anais do Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal da Fronteira Sul. v. 4, n.1,2014, Chapecó.
- BOCK, R. et al. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v.129, p. 247–269, 2004.
- BÖSE, R. et al. Current state and future trends in 300 the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v.57, p. 61-74, 1995.
- BRINKMAN, B. S.; KERSTING, K. W. Bovine anaplasmosis: an overview. **Iowa State University Veterinarian**, v.52, n.1, p.34-38, 1990.

CÂMARA, A. L. et al. Surtos de babesiose cerebral em bovinos leiteiros no nordeste brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**, p. 619 - 624, 2009.

CARVALHO, M.; GUERRA, L. M. M. Hemoparasitoses de bovinos em Portugal. **Albeitar**, n.5, p.120-127, 2012.

COELHO, L. C. T. **Anaplasmosse bovina: parâmetros clínicos e de patologia clínica em bezerros infectados experimentalmente**. 2007.65f. Dissertação (Mestrado em Clínica e Cirurgia Veterinárias) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2007.

COELHO, P. C. M. S.; ANGRIMANI, D. S. R.; MARQUES, E. S. Micoplasmose em felinos domésticos: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.16, p.1-14 jan. 2011.

COSTA JUNIOR, L.M. et al. Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites. **Veterinary Parasitology**, v.139, p. 231-236, 2006.

DUMLER J. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

EMATER, Projeto bovinocultura de leite. Disponível em: <<http://www.emater.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=68>>. Acesso em: 12nov. 2016.

ERIKS, I. S.; STILLER, D.; PALMER, G. H. Impact of Persistent *Anaplasma marginale* Rickettsemia on Tick Infection and Transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.8,p. 2091-2096, 1993.

FARD, R. M. N.; VAHEDI, S. M. V.; MOHAMMADKHAN, F. Haemotropic mycoplasmas (haemoplasmas): a review. **International journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v.2, n.5, p.1484-1503, 2014.

FELSHEIM, R. F. et al. Transformation of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v.167, p.167-174, 2010.

FOIL, L. D. Tabanids as vectors of disease agents. **Parasitology Today**, v.5, n.3, p. 88-96, 1989.

GARCIA, J. F.; UTSUNOMIYA, Y. T.; NUNES, C. M. Introdução à biologia molecular. In: JERICÓ, M. M.; NETO, J. P. A.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna em cães e gatos**. ed. 1, v. 1, Rio de Janeiro: Roca, 2015. p. 199-208.

GASPARINI, M. R. et al. Immune response of calves inoculated with proteins of *Anaplasma marginale* bound to an immunostimulant complex. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.22, n.2, p.253-259, abr-jun. 2013.

GENOVA, S. G. et al. Severe anemia associated with *Mycoplasma wenyonii* infection in a mature cow. **The Canadian Veterinary Journal**, v.52, p.1018-1021, set. 2011.

GIARDINA, S.; BRETÃNA, A.; MÁRQUEZ, Q. Ultrastructural aspects of intraerythrocytic development of a Venezuelan strain of *Anaplasma marginale*. **Tropenmedizin und Parasitologie**, v.34, n.1, p.7-10, 1983.

GIROTTTO, A. **Detecção molecular dos hemoparasitas *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ em bovinos leiteiros de assentamentos rurais localizados no estado do Paraná**. 2012. 59f. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

GIROTTTO, A. et al., Molecular detection and occurrence of ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ in dairy cattle of Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.21, n.3, p.342-344, jul.-set. 2012.

GIROTTTO-SOARES, A. et al., ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’: Transplacental transmission in dairy cows (*Bostaurus*). **Veterinary Microbiology**, v.195, p.22-24, 2016.

GLADDEN, N. et al. A case report of *Mycoplasma wenyonii* associated immune-mediated haemolytic anaemia in a dairy cow. **Irish Veterinary Journal**, v.69, n.1, p.1-8, 2016.

GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.187-194, 2000.

GOTZE, M. M.; NIZOLI, L. Q.; SILVA, S. S. Efeitos da oxitetraciclina na recomposição do hematócrito de vacas leiteiras durante surto de anaplasmosse bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, Supl.1, p.92-95, 2008.

GRAU, H. E. G. et al. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.22, n.2, p.189-193, abr-jun. 2013.

HOELZLE, K. et al. Detection of *Candidatus Mycoplasma haemobos* in cattle with anaemia. **The Veterinary Journal**, v.187, p.408–410, 2011.

HOMER, J. M. et al. Babesiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.3, jul. 2000.

HORNOK, S. et al. Molecular investigation of transplacental and vector-borne transmission of bovine haemoplasmas. **Veterinary Microbiology**, v.152, p.411–414, 2011.

HUNHOFF, G. F. **Dados estatísticos** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <planejamento.ERICA@toledo.pr.gov.br> em 11 maio 2016.

JOAZEIRO, A. C. P. **Detecção e diferenciação de *Anaplasma marginale* e *Anaplasma centrale* por reação em cadeia de polimerase (PCR)**. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2012.

JULIANO, R. S. et al. Soroepidemiologia da babesiose em rebanho de bovinos da raça Curraleiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.5, p.1387-1392, set-out. 2007.

JUNIOR, D. S. G. et al. Analysis of membrane protein genes in a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.105, n.7, p.843-849, nov. 2010.

KAVANAUGH, M. J.; DECKER, C. F. Babesiosis. **Disease a Month**, v.58, n.6, p.355-360, jun. 2012.

KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F. Anaplasmosis control: past, present and future. *Annals of the New York Academy of Science*, New York, v.916, n.1, p. 501-509, 2000.

KOCAN, K. M. et al. Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n 4, p.698-712, oct. 2003.

KOCAN, K. M., DE LA FUENTE, J. Co-feeding studies of ticks infected with *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v.112, n.4, p. 295-305, 2003.

KOCAN, K. M. et al. *Anaplasma marginale* (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*): recent advances in defining host–pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v.129, n.7, p. 285-300, 2004.

KOCAN, K. M. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v.167, p.95-107, 2010.

LABRUNA, M. B. **Doenças transmitidas por vetores**. In: BOWMAN, D. D. *Parasitologia Veterinária*. ed.9, Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p.229-241.

LAUGHERY, J. M. et al. Targeted Surface Expression of an Exogenous Antigen in Stably Transfected *Babesia bovis*. **PLoS ONE**, v.9, n.5, p.1-10, maio. 2014.

MADRUGA, C.R.; ARAUJO, F.R.; SOARES, C.O. S. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. ed. 3, Embrapa-gado de corte, 2001, 360p.

MADRUGA, C. R. et al. Desenvolvimento de uma prova de imunoabsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n.4, p.167-170, out./dez,2000.

MARANA, E. R. M. et al. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná, Brasil, por um teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.18, n.1, p.20-26, jan-mar, 2009.

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

MARTÍNEZ-OCAMPO, F. et al. Draft genome sequence of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*,” a hemotropic Mycoplasma identified in cattle in Mexico. **Genome Announcements**, v.4, n.4, p.1-2, jul/ago, 2016.

MASATANI, T. et al. Identification and functional analysis of a novel mitochondria-localized 2-Cys peroxiredoxin, BbTPx-2, from *Babesia bovis*. **Parasitology Research**, v.115, p.3139–3145, ago, 2016.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v.135, n.1, p.15-23, 2004.

MCFADDEN, A. et al. Investigation of bovine hemoplasmas and their association with anaemia in New Zealand cattle. **New Zeland Veterinary Journal**, v.64, n.1, p.65-68, 2016.

MELI, M. L. et al. Identification, Molecular Characterization, and Occurrence of Two Bovine Hemoplasma Species in Swiss Cattle and Development of Real-Time TaqMan Quantitative PCR Assays for Diagnosis of Bovine Hemoplasma Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.10, p.3563–3568, out. 2010.

MERINO, O. et al. Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. **Vaccine**, v.29, p.8575– 8579, 2011.

MESSICK, J. B. Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. **Veterinary Clinical Pathology**, v.33, n.1, p.1-13, 2004.

MTSHALI, M. S.; MTSHALI, P. S. Molecular diagnosis and phylogenetic analysis of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* hemoparasites from cattle in South Africa. **BMC Veterinary Research**, v.9, n. 154, p.1-7, 2013.

MOLAD, T. et al. Differentiation between Israeli *B. bovis* vaccine strain and field isolates. **Veterinary Parasitology**, v.208, p.159-168, 2015.

MOSQUEDA, J. et al. *Babesia bigemina*: Sporozoite Isolation from *Boophilus microplus* Nymphs and Initial Immunomolecular Characterization. **New York Academy of Sciences**, v.1026, p.222–231, 2004.

MOSQUEDA, J. et al. Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis, **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.1504-1518, 2012.

MOUMONI, P. F. A. et al. Molecular detection and characterization of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria* species and *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Kenya. **Parasites & Vectors**, v.8, p.2-14, set, 2015.

MOURA, A. B. et al. 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.

NISHIZAWA, I. et al. Differential Detection of Hemotropic *Mycoplasma* Species in Cattle by Melting Curve Analysis of PCR Products. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.72, n.1, p.77-79, 2010.

NEIMARK, H.; KOCAN, K. M. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a *Mycoplasma*. **FEMS Microbiology Letters**, v.156, p.287-291, 1997.

NEIMARK, H. et al. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.891-899, 2001.

O'DWYER, L. H. **Piroplasmida – Babesia spp.** In:MONTEIRO, S. G. Parasitologia na Medicina Veterinária. ed.1, São Paulo: Roca, 2010. p.159-167.

PALMER, G. H. et al. Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. **Science**, v. 321, p. 1299-1302, mar. 1986.

PENA, H. F. J. **Protozoários.** In: BOWMAN, D. D. Parasitologia Veterinária. ed.9, Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 81-106.

PIAU JUNIOR, R. P. et al. Prevalência de *Anaplasma* spp. em bovinos no município de Umuarama (PR). **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias Ambientais**, Curitiba, v.11, n.2, p.179-183, 2013.

QIN, S. Y. et al. First report of *Babesia bigemina* infection in white yaks in China. **Acta Tropica**, v.145, p.52-54, 2015.

RADOSTITS, O. M. **Diseases associated with bactéria.** In:RADOSTITS, O. M. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses. ed.10, p.1154-1156, 2007.

RIBEIRO, M. F. B. et al. Uso de inóculo padronizado de *Anaplasma marginale* e da quimioprofilaxia no controle da anaplasmoze bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.1, Belo Horizonte, fev. 2003.

RODRÍGUEZ, S. D. et al. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. **Infection Genetics and Evolution**, v.9, p.1092-1101, 2009.

SANTAROSA, B. P. et al. Infecção neurológica por *Babesia bovis* em bovino neonato – relato de caso. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, n.3, p.9-14, set. 2013.

SANTOS, H. Q.; LINHARES, G. F. C.; MADRUGA, C. R. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e ELISA. **Ciência Animal Brasileira**, v.2, n.2, p.133-137, jul./dez. 2001.

SANTOS, M. S. et al. Micoplasmose em cães – Relato de 4 casos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19, p.1298, 2014.

SASAOKA, F. et al. Examination of the 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Sequences of ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ and *Mycoplasma haemofelis*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.74, n.1, p.83–87, 2012.

SASAOKA, F. et al. Two Genotypes among ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ strains based on the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. **Journal of Veterinary Medical Science** v.75, n.3, p.361–364, 2013.

SASAOKA, F. et al. Vertical transmission of *Mycoplasma wenyonii* in cattle, supported by analysis of the ribonuclease P RNA gene. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.63, n.3, p.271–274, 2015.

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.

SHIMADA, M. K et al. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in larvae of *Boophilus microplus* ticks by Polymerase Chain Reaction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1026, p.95-102, out, 2004.

SILVA, J. B. et al. Detecção sorológica e molecular de *Anaplasma marginale* em búfalos na Ilha de Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n.1, p. 11-14, jan. 2014.

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

SOUZA, F. A. L. et al. Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in Northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, n.9, p.1057-1061, set. 2013.

SU, Q. L. et al. The detection of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle and buffalo in China, **Tropical Animal Health and Production**, v.42, n.8, p.1805–1808, jul.2010.

TAGAWA, M.; MATSUMOTO, K.; INOKUMA, H. Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and 'Candidatus Mycoplasma haemobos' in cattle in Hokkaido, Japan. **Veterinary Microbiology**, v.132, p.177–180, 2008.

TAVARES, F. M. Reflexões acerca da iatrogenia e educação médica. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v.31, n.2, p.180–185,2007.

THEILER, A. *Anaplasma marginale* (gen. spec. nov.). The marginale points in the blood of cattle suffering from a specific disease. **Report of the Government Veterinary Bacteriologist of the Transvaal**, p.7-64, 1910.

THEILER, A. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. **First Report of the Director of Veterinary Research**, p.7-46, ago. 1911.

TOLEDO, Revista Exame coloca Toledo entre as 100 melhores cidades brasileiras para investimentos. 2014. Disponível em: <<http://www.toledo.pr.gov.br/noticia/revista-exame-coloca-toledo-entre-as-100-melhores-cidades-brasileiras-para-investimentos>>. Acesso em: 21dezembro de 2016.

TRINDADE, H. I.; ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C. Tristeza parasitária bovina – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IX,n.16, p.1-21, jan. 2011.

VIDOTTO, M. C. et al. Phylogenetic Analysis of *Anaplasma marginale* Strains from Paraná State, Brazil, Using the msp1a and msp4 genes. **Journal of Veterinary Medicine**, v.53, n.9, p.404–411, 2006.

VIDOTTO, O. Gestão profilática das principais doenças parasitárias de bovinos. In: SANTOS, G. T. et al. **Bovinocultura de leite: Inovação tecnológica e sustentabilidade**. ed. 1. Maringá: EDUEM, 2008. p.105-125.

WITTER, R. et al. Prevalence of 'Candidatus Mycoplasma haemobos' detected by PCR, in dairy cattle from Ji-Paraná in the north region of Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.47, n.3, p.1-6, 2017.

ZAUGG, J. L. et al. Transmission of *Anaplasma marginale* by males *Dermacentor andersoni* stiles fed on an Idaho field-infected, chronic carrier cow. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.2269-2271, 1986.

ZAUGG, J. L. **Babesiose**. In: SMITH, B. P. *Medicina Interna de Grandes Animais*. ed.3, p.1051-1054, 2006

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência de *Anaplasma marginale* e gêneros de *Babesia* e *Mycoplasma* encontrados na população de bovinos leiteiros selecionados.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar por meio de ferramenta molecular (PCR) a prevalência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Mycoplasma wenyonii* e 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' em bovinos leiteiros do município de Toledo, localizado na região Oeste do Paraná, Brasil.

Verificar se o sistema de criação e a raça dos animais interferem no surgimento dos hemoparasitas nos rebanhos estudados.

5 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**PREVALÊNCIA DE HEMOPARASITAS EM BOVINOS LEITEIROS DO MUNICÍPIO
DE TOLEDO, PARANÁ, BRASIL**

RESUMO

A anaplasmosose, babesiose e micoplasmosose bovina são ocasionadas por microrganismos que possuem a capacidade de parasitar e causar alterações nos eritrócitos. Devido a inespecificidade dos sinais clínicos é preciso que o diagnóstico dessas enfermidades seja confirmado através de exames laboratoriais como esfregaço sanguíneo, reações sorológicas ou pela técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR). O presente trabalho teve como objetivo a detecção molecular de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Mycoplasma wenyonii* e 'Candidatus Mycoplasma haemobos' em bovinos leiteiros do município de Toledo, localizado na região Oeste do Paraná. Foram coletadas 376 amostras de bovinos assintomáticos, as quais foram submetidas à PCR para amplificação dos genes dos patógenos. Do total de amostras, 59,6% (224/376) foram positivas para *A. marginale*, 17,6% (66/376) positivas para *B. bigemina*, 24,2% (91/376) positivas para *B. bovis*, 17,8% (67/376) positivas para *M. wenyonii* e 12% (45/376) positivas para 'C. M. haemobos'. Os resultados mostraram animais com coinfeção com dois ou mais patógenos, 2,9% (11/376) deles foram positivos para os 5 microrganismos pesquisados. Das 53 propriedades estudadas, 96,2% (51/53) foram positivas para *A. marginale*, 43,4% (23/53) positivas para *B. bigemina*, 73,6% (39/53) positivas para *B. bovis*, 51% (27/53) positivas para *M. wenyonii* e 41,5% (22/53) positivas para 'C. M. haemobos'. O teste Qui-quadrado foi utilizado para a análise estatística dos dados. De acordo com os resultados encontrados no presente estudo, conclui-se que os agentes pesquisados estão distribuídos de forma heterogênea entre os animais da área estudada. As taxas de animais positivos oscilaram entre 12,0% e 59,6%, o que evidencia uma condição de instabilidade enzoótica, com alto risco de infecções para uma parcela significativa de animais susceptíveis. Esta situação sinaliza para a necessidade de diagnóstico e controle desses patógenos nos rebanhos estudados.

Palavras chave: Anaplasmosose, Babesiose, Micoplasmosose, Bovinocultura leiteira, PCR.

ABSTRACT

Anaplasmosis, babesiosis and bovine mycoplasmosis are caused by microorganisms, which parasite the erythrocytes and cause changes that destroy these cells. Due to the lack of specificity of the clinical signs, the diagnosis must be confirmed with laboratory tests such as blood smear, sorologic reactions or by polymerase chain reaction (PCR) technique. The present study aimed at the molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Mycoplasma wenyonii* and 'Candidatus Mycoplasma haemobos' in dairy cattle of Toledo municipality, localized in the west region of Paraná. A total of 376 blood samples of asymptomatic cattle were collected, which were submitted to PCR for amplification of pathogen genes. Of the total samples, 59,6% (224/376) were positive for *A. marginale*, 17,6% (66/376) positive for *B. bigemina*, 24,2% (91/376) positive for *B. bovis*, 17,8% (67/376) positive for *M. wenyonii* and 12% (45/376) positive for 'C. M. haemobos'. The results showed animals with coinfection with two or more pathogens, 2,9% (11/376) of them were positive for the five microorganisms studied. Of the 53 studied farms, 96,2% (51/53) were positive for *A. marginale*, 43,4% (23/53) positive for *B. bigemina*, 73,6% (39/53) positive for *B. bovis*, 51% (27/53) positive for *M. wenyonii* and 41,5% (22/53) positive for 'C. M. haemobos'. The chi-square test was used for the statistical analysis. According to the results found in the present study, it can be concluded that the agents studied are heterogeneously distributed among the animals of the region. Positive animal rates ranged from 12,0% to 59,6%, which shows a condition of enzootic instability, with a high risk of infections for a significant portion of susceptible animals. This situation indicates the need for the diagnosis and control of these pathogens in the herds studied.

Key words: Anaplasmosis, Babesiosis, Mycoplasmosis, Dairy Cattle, PCR.

5.1 INTRODUÇÃO

Dentre a diversidade de agentes infecciosos aos quais os bovinos estão expostos, encontram-se os hemoparasitas, estes afetam diretamente a produtividade dos bovinos, apontando assim a necessidade da identificação e combate desses agentes nos rebanhos (GIROTTTO et al., 2012).

No Brasil, a anaplasmoze bovina é ocasionada pela *Anaplasma marginale*, enquanto a babesiose possui como agentes etiológicos a *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (JULIANO et al., 2007; SILVA et al., 2014).

A. marginale é encontrada distribuída mundialmente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, apesar de sua situação epidemiológica no Brasil ser de estabilidade enzoótica, a prevalência varia de 12,3 a 100% no país (SOUZA et al., 2001, VIDOTTO; MARANA, 2001). Com relação a *B. bovis* e *B. bigemina*, o Brasil possui tanto regiões de estabilidade enzoótica (com prevalências acima de 80%) como de instabilidade enzoótica para ambos (ARAÚJO et al., 1997; SANTOS; LINHARES; MADRUGA, 2001; VIDOTTO et al., 1997).

A micoplasmose bovina é ocasionada pelos hemoplasmas *Mycoplasma wenyonii* e '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' (SASAOKA et al., 2015), estes desencadeiam hemólise dos eritrócitos e como consequência ocorre anemia (SASAOKA et al., 2012) perda de peso, febre, apatia (FARD, VAHEDI, MOHAMMADKHAN, 2014), queda na produção leiteira, infertilidade, edema escrotal e do úbere (GENOVA et al., 2011; GLADDEN et al., 2016; MARTÍNEZ-OCAMPO et al., 2016).

Ainda não foram adquiridas informações suficientes para que o ciclo de vida dos hemoplasmas seja elucidado e tem-se apenas a comprovação da transmissão via transplacentária no hospedeiro vertebrado (GIROTTTO-SOARES et al., 2016; HORNOK et al., 2011), mas sugere-se que carrapatos, insetos hematófagos e fômites possam carrear os agentes (FARD; VAHEDI; MOHAMMADKHAN, 2014; TAGAWA; MATSUMOTO; INOKUMA, 2008).

Adler e Ellenbongen (1934) foram os primeiros a detectarem amostras de sangue de bovinos infectados com *Eperitroozoon wenyonii*, hoje *Mycoplasma wenyonii*, a partir daí as pesquisas demonstraram distribuição mundial desse patógeno. Já o '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' foi descoberto por Tagawa, Matsumoto, Inokuma (2008), em amostras de sangue de bovinos do Japão e desde

então somente houveram outros relatos da presença do parasita na Suíça (MELI et al., 2010), China (SU et al., 2010), Hungria (HORNOK et al., 2011), Alemanha (HOELZLE et al., 2011), Brasil (GIROTTTO et al., 2012), Inglaterra (AYLING et al., 2012) e mais recentemente na Nova Zelândia (MCFADDEN et al., 2016) e México (MARTÍNEZ-OCAMPO et al., 2016). No Brasil existem apenas dois trabalhos sobre a prevalência dessa bactéria em populações de bovinos, tendo sido encontrado 61% no município de Londrina (GIROTTTO et al., 2012) e 64,2% em Ji-Paraná (WITTER et al., 2017).

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Mycoplasma wenyonii* e 'Candidatus Mycoplasma haemobos' em bovinos leiteiros do município de Toledo, região Oeste do Paraná, Brasil.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pela Comitê de Ética em Uso Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob o parecer 809/2013.

5.2.1 Amostras

O número total de vacas ordenhadas no município de Toledo é de 16.879 animais (HUNHOFF, 2016). Para calcular o número de amostras necessárias utilizou-se o programa OpenEpi. 3.01, tendo 5% de nível de significância, prevalência estimada de 50%, precisão de 5% e efeito de delineamento de 1,0; resultando em um tamanho de amostra de 376 animais.

A amostragem foi obtida em estágios múltiplos sorteando-se as propriedades do município de Toledo, estratificando-se o número de animais por propriedade e sorteando-se os bovinos de forma sistemática. Em cada propriedade foi coletado sangue de dez animais, exceto quando o rebanho apresentava número menor que este, neste caso procedeu a coleta de sangue de no mínimo cinco animais.

Durante o período de outubro de 2013 a dezembro de 2014 foram coletadas 376 amostras de sangue de vacas em lactação das raças Jersey, Holandesa e animais mestiços através de punção da veia coccígea, mamária ou jugular. O

sangue foi armazenado em tubos de 5 mL com EDTA para obtenção do sangue total e posterior realização da PCR. Esses bovinos foram provenientes de 53 propriedades do município de Toledo, região Oeste do estado do Paraná, Brasil. Todas as amostras coletadas foram conservadas em temperatura de 20°C negativos e posteriormente processadas nos Laboratórios da área de Parasitologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina.

5.2.2 Extração de DNA e PCR

Para extração do DNA foram utilizados 200 µL de cada amostra de sangue coletada. O DNA genômico total foi extraído utilizando o kit de extração PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante e armazenado a 20°C negativos até a análise pela PCR.

A PCR para cada agente infeccioso foi realizada com os oligonucleotídeos específicos (primers) e técnicas descritas nos trabalhos referenciados na Tabela 1. Em todas as reações utilizou-se dois controles negativos, um contendo apenas água ultrapura e o outro contendo todos os reagentes utilizados para a PCR, exceto DNA. Como controle positivo utilizou-se o DNA do patógeno pesquisado. Todas as amplificações foram realizadas no termociclador ProFlex™ PCR System® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Todos os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR® Safe (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Após a migração eletroforética dos 7 µL de material genético amplificado, o produto da PCR foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta. O 100 pb DNA ladder (Invitrogen, Eugene, OR, USA) foi utilizado como padrão para determinar o peso molecular dos produtos da PCR.

5.2.3 Análise estatística

O teste Qui-quadrado foi utilizado para a análise estatística dos dados, associou-se as variáveis raça e sistema de criação com a ocorrência de animais positivos. Os procedimentos operacionais foram feitos utilizando o software Epiinfo,

versão 7.2.1.0 (CDC, Atlanta, GA, EUA). Foram considerados resultados estatisticamente significantes quando $P \leq 0,05$.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando as vacas positivas por infecção simples ou coinfeção, foi observado 59,6% (224/376) dos animais infectados com *A. marginale*, 17,6% (66/376) com *B. bigemina*, 24,2% (91/376) com *B. bovis*, 17,8% (67/376) com *M. wenyonii* e 12% (45/376) com 'C. M. haemobos' (Tabela 2).

Do total de animais avaliados 68,4% (257/376) foram positivos para um ou mais agentes, enquanto 31,6% (119/376) animais foram negativos. Além disso, as infecções por um só agente apontaram como mais prevalente o *A. marginale* 25,5% (96/376), seguido por *B. bovis* 5,3% (20/376) e *B. bigemina* 0,5% (2/376) (Tabela 2).

Através da análise dos dados, pode-se observar que a prevalência para *A. marginale* encontrada foi menor do que a descrita por Brito et al. (2010) que utilizando a PCR detectou a ocorrência de 98,18% e 92,87% em bovinos microrregiões e mesorregiões de Rondônia, respectivamente. O resultado também foi menor do que o detectado através da RIFI por Barbieri et al. (2016), que descreveu a prevalência de 96,2% para *A. marginale* em bovinos da região Sul de Minas Gerais e Santos, Madrugá, Linhares (2001) que encontraram prevalência de 96,92% em bovinos da microrregião de Goiânia (GO) e Souza et al. (2001) que pelo ELISA descreveu a prevalência de 98,21% na mesorregião do Médio Paraíba (Rio de Janeiro).

A prevalência encontrada para *A. marginale* no presente estudo foi semelhante a 58,74% detectada em bovinos no Centro-Sul do Paraná por Marana et al. (2009) através da cELISA e superior a 27,24% apresentado por Vieira (2014) na região serrana de Santa Catarina pela multiplex-PCR.

Com relação ao resultado encontrado para *B. bigemina* neste trabalho, foi semelhante ao descrito por Vieira (2014) que detectou 16,73% de animais positivos com a técnica da multiplex-PCR em Santa Catarina e menor do que a encontrada através da RIFI por Madrugá et al. (2000) de 94,03% em bovinos de quatro municípios distintos no Rio de Janeiro.

No estudo realizado por Barros et al. (2005) através de ELISA em Senhor do Bonfim (86%), Euclides da Cunha (95,5%), Uauá (63,7%), Juazeiro (56,4%), cidades

que compõem a região semiárida da Bahia, também foram encontrados resultados superiores ao do presente estudo para *B. bigemina*.

Ainda na pesquisa através de ELISA realizada por Barros et al. (2005) pode-se verificar a prevalência de 90,8% de *B. bovis* em Senhor do Bonfim, 91,3% em Euclides da Cunha, 53% em Uauá e 54,8% em Juazeiro. Com a técnica de RIFI, na microrregião de Goiânia (98,9%) e no Rio de Janeiro (82,11%) também foram encontrados resultados superiores aos do presente estudo (MADRUGA et al., 2000; SANTOS; LINHARES; MADRUGA, 2001). Já em Santa Catarina, o resultado obtido por Vieira (2014) foi semelhante ao deste trabalho, tendo 29,57% de prevalência para *B. bovis*.

No território brasileiro, grande parte das propriedades leiteiras estão em áreas de estabilidade enzoótica para *A. marginale* e *B. bovis*, com soroprevalência variando de 80 a 100% e tendo equilíbrio entre imunidade e doença (BARBIERI et al., 2016). Os dados do presente estudo, sugerem que a região estudada seja de instabilidade enzoótica para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*.

Contudo, é importante destacar que, na maioria dos estudos epidemiológicos realizados com *Babesia* spp. e *A. marginale* no Brasil, foram utilizados testes sorológicos como a RIFI e ELISA. É sabido que os animais portadores são mantêm níveis de anticorpos séricos detectáveis pelos testes sorológicos por longos períodos (MADRUGA et al., 2001). Por outro lado, após a infecção aguda, com manifestações clínicas ou não, a parasitemia, tanto de *Babesia* spp. como *A. marginale*, cai para níveis muito baixos (MARTINS; CORRÊA, 1995). No presente estudo utilizou-se a PCR para identificar animais portadores são, embora essa técnica apresente uma sensibilidade elevada, pode ser que uma parcela significativa de animais portadores não tenha sido detectada, mas que poderia ter sido por um teste sorológico que detecta anticorpos de infecções recentes e passadas. Isso poderia explicar, por exemplo, as baixas prevalências encontradas para *B. bigemina* na região estudada.

A transmissão da *A. marginale* ocorre através do *R. microplus*, *H. irritans*, *S. calcitrans* (SILVA et al., 2014), fômites (KOCAN et al., 2010) e também por via transplacentária (GRAU et al., 2013). Já a *B. bovis* e *B. bigemina* possuem o *R. microplus* como único vetor biológico no território brasileiro (JULIANO et al., 2007) e podem ser transmitidos congenitamente e por transfusão sanguínea (KAVANAUGH, DECKER, 2012; MOSQUEDA et al., 2004).

Baseado nas informações epidemiológicas sobre os vetores e os mecanismos de transmissão desses patógenos, pode-se levantar a possibilidade de que o controle intensivo do vetor *R. microplus* nas propriedades seja responsável pela baixa prevalência de *B. bovis* e *B. bigemina*, e que outros vetores da *A. marginale*, como *H. irritans* e *S. calcitrans* sejam responsáveis pela manutenção do agente, explicando assim sua maior prevalência frente as babesias, que possuem apenas o *R. microplus* como vetor no território brasileiro.

A distribuição geográfica de *Babesia* spp. é limitada pela presença do vetor *R. microplus*, que necessita de condições climáticas favoráveis para o seu desenvolvimento (BARCI et al., 1994). Sendo assim, pela observação das informações epidemiológicas disponíveis sobre esses três agentes infecciosos, pode-se observar uma tendência de taxas de prevalências menores na região Sul, diferença que poderia estar ocorrendo devido as condições climáticas extremas de baixas temperaturas e umidade nessa região.

Com relação aos hemoplasmas, o primeiro relato com uso de PCR foi divulgado no Japão na cidade de Miyagi. Em uma amostragem de 109 animais, Nishizawa et al. (2010) detectaram 22,9% das amostras positivas para *M. wenyonii* e 61,5% para 'C.M. haemobos'.

No Brasil, Giroto et al. (2012) relataram pela primeira vez 'C. M. haemobos em bovinos da região de Londrina (Paraná) com uma prevalência de 60,97% e recentemente Witter et al. (2017) encontraram 64,2% na população de bovinos de Ji-Paraná, Rondônia. Esses resultados estão bem acima dos encontrados no presente estudo, onde a prevalência foi de 12,8%. Da mesma forma a prevalência encontrada de 17,8% para *M. wenyonii* constitui-se no primeiro relato dessa espécie, utilizando ferramentas moleculares, em bovinos no Brasil.

Em um estudo realizado em búfalos da baixada maranhense, de 314 amostras de sangue analisadas pela PCR, Dos Santos (2017) constatou que 9,55% eram positivas para *M. wenyonii* e 2,55% para 'C. M. haemobos', resultado inferior ao encontrado no presente estudo.

Analisando os dados da Tabela 2, chama a atenção o fato que todos os bovinos infectados com *M. wenyonii* ou *M. haemobos* apresentaram-se sempre coinfectados com *A. marginale*, *B. bigemina* ou *B. bovis*, sugerindo que os hemoplasmas devem ser microrganismos oportunistas, infectando animais em

períodos que estejam debilitados por outra infecção intercorrente, como demonstrado nesse trabalho.

Apesar de o vetor dos hemoplasmas ainda não ser conhecido e as formas de transmissão ainda não estarem elucidadas, pode-se sugerir que carrapatos sejam responsáveis pela transmissão desses agentes, visto que houve coinfeção com *A. marginale*, *B. bigemina* ou *B. bovis* em 100% das amostras positivas para *M. wenyonii* e 'C. M. haemobos', sinalizando um possível contato dos bovinos com carrapatos, principalmente no caso de infecção por *Babesia* spp.

Quando os dados do presente trabalho são analisados levando-se em conta as propriedades, observa-se ampla distribuição de *A. marginale* e *B. bovis* nos rebanhos do município de Toledo, apresentando ocorrência de 96,2% e 73,6% respectivamente, e menor distribuição de *B. bigemina*, com ocorrência de 43,4%. Esses dados podem reforçar ideia de que apesar de o agente infeccioso estar presente nas propriedades, a transmissão é limitada devido ao controle de vetores.

Apesar de o *M. wenyonii* e 'C. M. haemobos' apresentarem prevalência em nível de rebanho de 17,8% e 12% respectivamente, sua ocorrência em nível de propriedades foi de 51% e 41,5%, sinalizando que mesmo com baixa prevalência em nível de rebanho, possui potencial de disseminação nas propriedades.

Na avaliação dos animais coinfectados com dois ou mais agentes, observou-se que o *A. marginale* estava presente em 128/139 animais, representando 92,1%. A infecção quádrupla ocorreu em 2,9% (11/376) dos animais. A coinfeção de maior prevalência foi a infecção dupla pelo *A. marginale* e *B. bovis* com 10,1% (38/376) animais.

A variável raça apresentou associação estatisticamente significativa ($P < 0,05$) para três agentes avaliados pela PCR, sendo o *A. marginale* e a *B. bigemina* mais prevalentes na raça Jersey (74%; 37/50 e 26%; 13/50, respectivamente) e a *B. bovis* em animais mestiços (32,2%; 29/90). O 'C. M. haemobos' e *M. wenyonii* não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) e a prevalência entre as raças para ambos os agentes variou de 3,9 a 22%, de acordo com a Tabela 3.

Nenhum dos três sistemas de criação avaliados apresentou significância estatística para os agentes pesquisados ($P > 0,05$). No entanto, as maiores prevalências, independente do sistema de criação, foram atribuídas ao *A. marginale*, variando de 52 a 60,8%.

O sistema de criação intensivo apresentou baixa ocorrência para os agentes *B. bigemina* (0/25), 'C. M. haemobos' (4%; 1/25) e *M. wenyonii*, (4%; 1/25), enquanto a *B. bovis* apresentou ocorrência de 20,0% (5/25). Os sistemas de criação extensivo e semi-intensivo, variaram de 10,0 a 25,2% entre a *B. bigemina*, *B. bovis*, 'C. M. haemobos' e *M. wenyonii* (Tabela 3).

A maior incidência de *A. marginale*, independentemente de o animal estar em sistema confinado, semi-confinado ou extensivo pode ser explicado pelo fato deste patógeno ser transmitido também por insetos hematófagos, por exemplo, a *S. calcitrans*, muito comum nos estábulos. Da mesma forma, as prevalências inferiores encontradas nos sistemas intensivo e semi-intensivo para *Babesia* spp. e hemoplasmas, podem ser atribuídas ao sistema vetorial de transmissão desses patógenos, uma vez que é sabido que as larvas infectadas do carrapato transmissor se encontram nas pastagens.

5.4 CONCLUSÕES

Com bases nos resultados obtidos pode-se concluir que *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Mycoplasma wenyonii* e 'C. M. haemobos' estão disseminados nos rebanhos leiteiros da região de Toledo, Paraná.

Pelos critérios estabelecidos que levam em conta as taxas de infecções para *A. marginale* e *Babesia* spp, a região estudada é de instabilidade enzoótica, uma vez que apresentou índices menores de 80% de positividade para todos os patógenos estudados.

Os animais da raça Jersey apresentaram maior prevalência para *A. marginale* e *B. bigemina* em relação as outras raças, enquanto os animais mestiços foram mais suscetíveis a *B. bovis*. O sistema de criação não apresentou associação com a ocorrência dos agentes pesquisados.

Esse é o primeiro relato de *Mycoplasma wenyonii* em bovinos no Brasil, comprovado pelo uso de ferramentas moleculares, e o terceiro levantamento epidemiológico no qual é encontrado 'C. Mycoplasma haemobos' em território brasileiro.

5.6 REFERÊNCIAS

- ADLER, S., ELLENBONGEN, V. A note on two new blood parasites of cattle, *Eperythrozoon* and *Bartonella*. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v.47, p.219-221, 1934.
- ARAÚJO, F. R. et al. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no Estado de Bahia pela imunofluorescência indireta e teste de congulinacão rápida. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, n.2, p.111-115, 1997.
- AYLING, R. D. et al. Detection of ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’, *Mycoplasma wenyonii* and *Anaplasma phagocytophilum* from cattle in England. **Veterinary Record**, v.170, n.21, p.543a, 2012. 2012 (short communications).
- BARCI, L. A. G. et al. Epidemiologia da babesiose bovina no estado de São Paulo: I. Estudo em rebanhos produtores de leite tipo B do município de Pindamonhangaba, Vale do Paraíba. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.3, n.2, p.79-82, 1994.
- BARBIERI, J. M. et al. Seroprevalence of *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale*, and *Babesia bovis* in dairy cattle. **Ciência Animal Brasileira**, v.17, n.4, p. 564-573, out./dez, 2016.
- BARROS, S. L. et al. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, byenzyme-linked immunosorbent assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.6, p.513-517, out. 2005.
- BRITO, L. G. et al. *Anaplasma marginale* infection in cattle from south western Amazonia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.3, p.249-254, março, 2010.
- DIECKMANN, S. M. et al. Haemotrophic *Mycoplasma* infection in horses. **Veterinary Microbiology**, v.145, p.351–353, 2010.
- DOS SANTOS, N. J. R. **Ocorrência e caracterização molecular de hemoplasmas em búfalos do Maranhão**. 34f. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.
- FARD, R. M. N.; VAHEDI, S. M. V.; MOHAMMADKHAN, F. Haemotropic mycoplasmas (haemoplasmas): a review. **International journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v.2, n.5, p.1484-1503, 2014.
- GENOVA, S. G. et al. Severe anemia associated with *Mycoplasma wenyonii* infection in a mature cow. **The Canadian Veterinary Journal**, v.52, p.1018-1021, set. 2011.
- GIROTTO, A. et al., Molecular detection and occurrence of ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ in dairy cattle of Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.21, n.3, p.342-344, jul.-set. 2012.

GIROTTI-SOARES, A. et al., '*Candidatus Mycoplasma haemobos*': transplacental transmission in dairy cows (*Bostaurus*). **Veterinary Microbiology**, v.195, p.22-24, 2016.

GLADDEN, N. et al. A case report of *Mycoplasma wenyonii* associated immune-mediated haemolytic anaemia in a dairy cow. **Irish Veterinary Journal**, v.69, n.1, p.1-8, 2016.

GRAU, H. E. G. et al. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.22, n.2, p.189-193, abr-jun. 2013.

HOELZLE, K. et al. Detection of *Candidatus Mycoplasma haemobos* in cattle with anaemia. **The Veterinary Journal**, v.187, p.408–410, 2011.

HORNOK, S. et al. Molecular investigation of transplacental and vector-borne transmission of bovine haemoplasmas. **Veterinary Microbiology**, v.152, p.411–414, 2011.

HUNHOFF, G. F. **Dados estatísticos** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <planejamento.ERICA@toledo.pr.gov.br> em 11 maio 2016.

JOAZEIRO, A. C. et al. A PCR for Differentiate between *Anaplasma marginale* and *A. centrale*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.43, p. 1-7, 2015.

JULIANO, R. S. et al. Soroepidemiologia da babesiose em rebanho de bovinos da raça Curraleiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.5, p.1387-1392, set-out. 2007.

KAVANAUGH, M. J.; DECKER, C. F. Babesiosis. **Disease a Month**, v.58, n.6, p.355-360, jun. 2012.

KOCAN, K. M. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v.167, p.95-107, 2010.

LINHARES, G. F. C. et al. Assessment of primers 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, jul./dez. 2002.

MADRUGA, C. R. et al. Prevalence of antibodies against *Babesia bovis* (Babes, 1888) and *B. bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) (Apicomplexa: Babesiidae) in cattle from four municipalities of Rio de Janeiro State. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.7, n.2, p.113-116, mai-ago, 2000.

MARANA, E. R. M. et al. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná, Brasil, por um teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.1, p.20-26, jan.-mar. 2009.

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

MARTÍNEZ-OCAMPO, F. et al. Draft genome sequence of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” a hemotropic Mycoplasma identified in cattle in Mexico. **Genome Announcements**, v.4, n.4, p.1-2, jul/ago, 2016.

MCFADDEN, A. et al. Investigation of bovine hemoplasmas and their association with anaemia in New Zealand cattle. **New Zealand Veterinary Journal**, v.64, n.1, p.65-68, 2016.

MELI, M. L. et al. Identification, molecular characterization, and occurrence of two bovine hemoplasma species in swiss cattle and development of real-time TaqMan quantitative PCR assays for diagnosis of bovine hemoplasma infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.10, p.3563–3568, out. 2010.

MOSQUEDA, J. et al. *Babesia bigemina*: Sporozoite isolation from *Boophilus microplus* nymphs and initial immunomolecular characterization. **New York Academy of Sciences**, v.1026, p.222–231, 2004.

NISHIZAWA, I. et al. Differential Detection of Hemotropic *Mycoplasma* Species in Cattle by Melting Curve Analysis of PCR Products. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.72, n.1, p.77–79, 2010.

SANTOS, H. Q.; LINHARES, G. F. C.; MADRUGA, C. R. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia, determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e ELISA. **Ciência Animal Brasileira**, v.2, n.2, p.133-137, jul./dez. 2001.

SANTOS, H. Q.; MADRUGA, C. R.; LINHARES, G. F. C. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia, pela reação de imunofluorescência indireta e ELISA. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.8, n.1, p.31-34, jan./abr. 2001.

SASAOKA, F. et al. Examination of the 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Sequences of ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ and *Mycoplasma haemofelis*. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.74, n.1, p.83–87, 2012.

SASAOKA, F. et al. Vertical transmission of *Mycoplasma wenyonii* in cattle, supported by analysis of the ribonuclease P RNA gene. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.63, n.3, p.271–274, 2015.

SILVA, J. B. et al. Detecção sorológica e molecular de *Anaplasma marginale* em búfalos na Ilha de Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.1, p.11-14, jan. 2014.

SOUZA, J. C. P. et al. Prevalência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do Médio Paraíba. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.309-314, 2001.

SU, Q. L. et al. The detection of “*Candidatus Mycoplasma haemobos*” in cattle and buffalo in China, **Tropical Animal Health and Production**, v.42, n.8, p.1805–1808, jul. 2010.

TAGAWA, M.; MATSUMOTO, K.; INOKUMA, H. Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ in cattle in Hokkaido, Japan. **Veterinary Microbiology**, v.132, p.177–180, 2008.

VIEIRA, L. L. **Prevalência e dinâmica de infecções por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos na região serrana de Santa Catarina**. 87f. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages. 2014.

VIDOTTO, O. et al. Frequência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da região de Londrina, Paraná. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v.49, n.5, p.655-659, out. 1997.

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

WITTER, R. et al. Prevalence of ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ detected by PCR, in dairy cattle from Ji-Paraná in the north region of Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.47, n.3, p.1-6, 2017.

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina*, Hemoplasmas, *M. wenyonii* e ‘*C. M. haemobos*’ pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Espécie (gene)	Primers	(pb)	Referência
<i>A. marginale</i> (MSP4)	F: 5’CCCATGAGTCACGAAGTGG3’ R: 5’GCTGAACAGGAATCTTGCTCC3’	753	Joazeiro (2015)
<i>B. bovis</i> (SSRNAr)	F: 5’CTGTCGTACCGTTGGTTGAC3’ R: 5’CGCACGGACGGAGACCGA3’	541	Linhares et al. (2002)
<i>B. bigemina</i> (SSRNAr)	F: 5’GTTGGGTCTTTTCGCTGGC3’ R: 5’CCACGCTTGAAGCACAGGA3’	685	Linhares et al. (2002)
Hemoplasmas (16S DNAr)	F: 5’GGCCCATATTCCT(AG)CGGGAAG3’ R: 5’AC(AG)GGATTACTAGTGATTCCA3’	1000	Dieckmann et al. (2010)
<i>M. wenyonii</i> (16SRNAr)	F: 5’ACTTTTACGAGGAGGATAGC3’ R: 5’TGATTA ACTCTAGGGAGGCG3’	530	Nishiwaza et al. (2010)
‘ <i>C. M. haemobos</i> ’ (16SRNAr)	F: 5’ATCTAACATGCCCTCTGTA3’ R: 5’GTAGTATTCGGTGCAAACAA3’	500	Nishiwaza et al. (2010)

F = forward primer; R= reverse primer; pb= pares de bases.

Tabela 2. Ocorrências de infecções simples e coinfeções detectadas pela PCR de sangue de vacas colhidos entre outubro de 2013 a dezembro de 2014 no município de Toledo, Paraná, Brasil.

Espécies infectantes (n=376 animais)	Positivo	%
Infecção simples		
<i>A. marginale</i>	96	25,5
<i>B. bovis</i>	20	5,3
<i>B. bigemina</i>	2	0,5
Infecção dupla		
<i>A. marginale</i> + <i>B. bovis</i>	38	10,1
<i>A. marginale</i> + <i>B. bigemina</i>	20	5,3
<i>A. marginale</i> + <i>M. wenyonii</i>	16	4,3
<i>A. marginale</i> + 'C. M. haemobos'	1	0,3
<i>B. bigemina</i> + <i>B. bovis</i>	3	0,8
<i>B. bigemina</i> + 'C. M. haemobos'	2	0,5
<i>B. bigemina</i> + <i>M. wenyonii</i>	1	0,3
'C. M. haemobos' + <i>M. wenyonii</i>	1	0,3
Infecção tripla		
<i>A. marginale</i> + <i>B. bigemina</i> + <i>B. bovis</i>	6	1,6
<i>A. marginale</i> + <i>B. bigemina</i> + <i>M. wenyonii</i>	5	1,3
<i>A. marginale</i> + <i>B. bovis</i> + <i>M. wenyonii</i>	4	1,1
<i>A. marginale</i> + 'C. M. haemobos' + <i>M. wenyonii</i>	10	2,7
<i>B. bigemina</i> + <i>B. bovis</i> + 'C. M. haemobos'	1	0,3
<i>B. bigemina</i> + 'C. M. haemobos' + <i>M. wenyonii</i>	1	0,3
<i>B. bovis</i> + 'C. M. haemobos' + <i>M. wenyonii</i>	1	0,3
Infecção quádrupla		
<i>A. marginale</i> + <i>B. bigemina</i> + 'C. M. haemobos' + <i>M. wenyonii</i>	11	2,9
<i>A. marginale</i> + <i>B. bigemina</i> + <i>B. bovis</i> + 'C. M. haemobos'	1	0,3
<i>A. marginale</i> + <i>B. bigemina</i> + <i>B. bovis</i> + <i>M. wenyonii</i>	1	0,3
<i>A. marginale</i> + <i>B. bovis</i> + 'C. M. haemobos' + <i>M. wenyonii</i>	4	1,1
<i>B. bigemina</i> + <i>B. bovis</i> + 'C. M. haemobos' + <i>M. wenyonii</i>	1	0,3
Infecção quántupla		
<i>A. marginale</i> + <i>B. bigemina</i> + <i>B. bovis</i> + 'C. M. haemobos' + <i>M. wenyonii</i>	11	2,9
Total	257	68,4

Tabela 3. Associação de vacas positivas para os agentes *A. marginale*, *B. bigemina*, *B. bovis*, 'C. M. haemobos' e *M. wenyonii* com as variáveis raça e sistema de criação, avaliadas por PCR em 376 amostras de sangue colhidos entre outubro de 2013 a dezembro de 2014 no município de Toledo, Paraná, Brasil.

Variáveis	<i>A. marginale</i>			<i>B. bigemina</i>			<i>B. bovis</i>			'C. M. haemobos'			<i>M. wenyonii</i>		
	Pos./total	%	P	Pos./total	%	P	Pos./total	%	P	Pos./total	%	P	Pos./total	%	P
*Raça (n=306)															
Holandesa (H)	65/115	56.5		13/115	11.3		22/115	19.1		13/115	11.3		18/115	15.7	
Jersey (J)	37/50	74.0	0.031	13/50	26.0	0.027	7/50	14.0	0.037	6/50	12.0	0.228	11/50	22.0	0.609
Holandesa/Jersey	23/51	45.1		4/51	7.8		9/51	17.7		2/51	3.9		8/51	15.7	
Mestiço	53/90	58.9		10/90	11.1		29/90	32.2		5/90	5.6		12/90	13.3	
**Sistema de criação (n=376)															
Intensivo	13/25	52.0		0/25	0.0		5/25	20.0		1/25	4.0		1/25	4.0	
Extensivo	16/30	53.3	0.531	6/30	20.0	0.057	5/30	16.7	0.508	3/30	10.0	0.404	6/30	20.0	0.172
Semi-intensivo	195/321	60.8		60/321	18.7		81/321	25.2		41/321	12,8		60/321	18.7	

*Para a análise, foram considerado os animais cujo registro de raça foi possível resgatar, totalizando 306 animais. O tipo racial atribuído, foi considerado o predominante na propriedade e não a raça dos indivíduos avaliados.

**Os critérios para estabelecer os sistemas de criação foram: Intensivo - animais confinados com suplementação nutricional; Extensivo - animais exclusivamente a pasto; Semi-intensivo - animais a pasto com suplementação nutricional.

Pos.= positivos; n= número.

APÊNDICE

ANEXO A

Prevalências encontradas para *Anaplasma marginale* no Brasil.

Técnica	%	Região	Referência
PCR	98,18%	Microrregiões de Rondônia	Brito et al. 2010
PCR	92,87%	Mesorregiões de Rondônia	Brito et al. 2010
RIFI	96,2%	Região Sul de Minas Gerais	Barbieri et al. 2016
RIFI	96,92%	Microrregião de Goiânia (Goiás)	Santos, Madruga, Linhares, 2001
ELISA	98,21%	Mesorregião do Médio Paraíba (Rio de Janeiro)	Souza et al. 2001
cELISA	58,74%	Centro-Sul do Paraná	Marana et al. 2009
Multiplex-PCR	27,24%	Região serrana (Santa Catarina)	Vieira, 2014

ANEXO B

Prevalências encontradas para *Babesia bovis* no Brasil.

Técnica	%	Região	Referência
RIFI	98,9%	Microrregião de Goiânia	Santos, Madruga, Linhares, 2001
ELISA	91,3%	Euclides da Cunha (Bahia)	Barros et al. 2005
ELISA	90,8%	Senhor do Bonfim (Bahia)	Barros et al. 2005
RIFI	82,11%	Quatro municípios do Rio de Janeiro	Madruga et al. 2000
ELISA	54,8%	Juazeiro (Bahia)	Barros et al. 2005
ELISA	53%	Uauá (Bahia)	Barros et al. 2005
Multiplex-PCR	29,57%	Região serrana (Santa Catarina)	Vieira, 2014

ANEXO C

Prevalências encontradas para *Babesia bigemina* no Brasil.

Técnica	%	Região	Referência
ELISA	95,5%	Euclides da Cunha (Bahia)	Barros et al. 2005
RIFI	94,03%	Quatro municípios do Rio de Janeiro	Madruga et al. 2000
ELISA	86%	Senhor do Bonfim (Bahia)	Barros et al. 2005
ELISA	63,7%	Uauá (Bahia)	Barros et al. 2005
ELISA	56,4%	Juazeiro (Bahia)	Barros et al. 2005
Multiplex-PCR	16,73%	Região serrana (Santa Catarina)	Vieira, 2014