Ciência Animal Brasileira
Brazilian Animal Science

DOI: 10.1590/1809-6891v27e-85464P

e-ISSN 1809-6891
Medicina veterinária | Artigo científico

Detecção de *Anaplasma marginale, Babesia bigemina* e *Babesia bovis* por diferentes técnicas de diagnóstico em bovinos do munícipio de Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil

[Detection of *Anaplasma marginale, Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by different diagnostic techniques in cattle from the Vassouras municipality, Rio de Janeiro, Brazil]

Jônathan David Ribas Chagas[1], Matheus Dias Cordeiro[1], Izabela Mesquita Araújo[1], Philipe Mariano Almeida Fontes[2], Renata Fernandes Ferreira de Moraes[2], Erica Cristina Rocha Roier[2], Nathalie da Costa Cunha[3], Bruna de Azevedo Baêta*[1]

1 Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil
2 Universidade de Vassouras (UNIVASSOURAS), Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil
3 Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Rio de Janeiro, Brasil

*autor correspondente: babaeta@ufrrj.br

Recebido: 12 de março de 2026. Aceito: 07 de julho de 2026. Publicado: 12 de agosto de 2026.
Editor: Luiz Augusto B. Brito

Resumo: Este estudo teve como objetivo determinar a presença de *Anaplasma marginale, Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bovinos do município de Vassouras (Rio de Janeiro, Brasil) utilizando diferentes técnicas de diagnóstico. Amostras de sangue foram coletadas de 226 animais em oito propriedades rurais, utilizando tubos de coleta com e sem anticoagulante. Realizou-se a extração de DNA e análises moleculares utilizando iniciadores específicos para os genes *msp5* (*A. marginale*), *sbp-4* (*B. bovis*) e *rap-1a* (*B. bigemina*). Além disso, foram preparados esfregaços sanguíneos e realizado o teste sorológico ELISA indireto. A técnica de nested PCR revelou frequências de 73,5 % para *A. marginale*, 27,9 % para *B. bovis* e 35 % para *B. bigemina*. No exame de esfregaço sanguíneo, *A. marginale* foi detectado em 42,9 % dos animais, enquanto *Babesia* spp. foram observadas em apenas 0,88 % deles. As taxas de soropositividade foram de 26,5 % para *A. marginale*, 27,9 % para *B. bigemina* e 66,4 % para *B. bovis*. Animais com até um ano de idade apresentaram maiores frequências de infecção pelo diagnóstico molecular, e *A. marginale* foi o patógeno mais frequentemente associado à anemia. Estes resultados confirmam a circulação ativa desses hemoparasitos em bovinos da área de estudo e destacam a importância do uso de abordagens diagnósticas complementares para melhor compreender a epidemiologia das doenças bovinas transmitidas por carrapatos.

Palavras-chave: Tristeza parasitária bovina, PCR, sorologia, esfregaço sanguíneo, epidemiologia.

Abstract: This study aimed to determine the presence of *Anaplasma marginale, Babesia bigemina,* and *Babesia bovis* in cattle from the Vassouras municipality (Rio de Janeiro, Brazil) using different diagnostic techniques. Blood samples were collected from 226 animals across eight farms using collection tubes with and without anticoagulant. DNA extraction was performed, and molecular analyses were carried out using specific primers targeting the *msp5* (*A. marginale*), *sbp-4* (*B. bovis*), and *rap-1a* (*B. bigemina*) genes. In addition, blood smears were prepared, and indirect ELISA serological testing was performed. Nested PCR revealed frequencies of 73.5 % for *A. marginale*, 27.9 % for *B. bovis*, and 35 % for *B. bigemina*. In the blood smear examination, *A. marginale* was

Copyright ©. Este é um artigo em acesso aberto distribuído nos termos da Creative Commons Attribution License que permite o uso irrestrito, a distribuição e reprodução em qualquer meio desde que o artigo original seja devidamente citado.

detected in 42.9 % of the animals, whereas *Babesia* spp. were observed in only 0.88 % of them. Seropositivity rates were 26.5 % for *A. marginale*, 27.9 % for *B. bigemina*, and 66.4 % for *B. bovis*. Animals up to one year of age showed higher infection frequencies by molecular diagnosis, and *A. marginale* was the pathogen most frequently associated with anaemia. These findings confirm the active circulation of these haemoparasites in cattle from the study area and highlight the importance of using complementary diagnostic approaches to better understand the epidemiology of bovine tick-borne diseases.

Keywords: bovine tick-borne diseases, PCR, serology, blood smear, epidemiology.

1. Introdução

Os carrapatos e os patógenos por eles transmitidos estão entre as principais causas de perdas econômicas na produção de bovinos no Brasil [1], destacando-se a tristeza parasitária bovina (TPB). A TPB compreende a babesiose, causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, e a anaplasmose, causada pela bactéria *Anaplasma marginale*. Esses patógenos são parasitos intracelulares obrigatórios que, isoladamente, podem causar doença em bovinos [2]. No entanto, a coinfecção pode aumentar a gravidade dos sinais clínicos, causando anemia, bilirrubinemia, febre, anorexia, letargia, ataxia, icterícia, palidez de mucosas, taquipneia, hemoglobinúria, tremores musculares e ranger de dentes [3, 4].

A transmissão de *Babesia* spp. ocorre principalmente pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*, enquanto *A. marginale* pode ser transmitida tanto por vetores biológicos, como artrópodes hematófagos, quanto mecanicamente por meio de fômites [5-7]. Além disso, a transmissão transplacentária já foi demonstrada para as três espécies [8]. As condições ambientais das regiões tropicais e subtropicais proporcionam ao vetor condições favoráveis para sua reprodução, influenciando a dinâmica epidemiológica e as áreas de endemicidade desses hemoparasitos [9, 10].

Considerando a relevância da TPB para a pecuária nacional e as diferenças entre os métodos diagnósticos quanto à capacidade de detectar infecção ativa e exposição prévia, a escolha da ferramenta diagnóstica pode impactar a interpretação epidemiológica dos resultados [11]. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo determinar a presença de *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* em bovinos do município de Vassouras (Rio de Janeiro, Brasil), utilizando técnicas moleculares, citológicas e sorológicas (nPCR/snPCR, esfregaço sanguíneo e ELISA indireto, respectivamente).

2. Material e métodos

2.1 Aprovação ética

O presente estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade de Vassouras, sob protocolo nº 044/2016.

2.2 Coleta de amostras

O tamanho mínimo da amostra foi determinado utilizando a seguinte fórmula: $N = \frac{p.(100-p).\ Z^2}{(\frac{d.p}{100})^2}$, em que N representa o número de amostras, p a prevalência esperada, Z o nível de confiança e d a margem de erro. Considerando uma prevalência esperada de 50 %, um intervalo de confiança de 95 % e uma margem de erro de 7 %, o tamanho mínimo da amostra foi estimado em 196 animais. As visitas às propriedades participantes no município de Vassouras (Rio de Janeiro, Brasil; Latitude: 22° 24' 16" Sul, Longitude: 43° 39' 48" Oeste) foram realizadas entre novembro de 2017 e janeiro de 2019, e a seleção foi realizada por amostragem por conveniência.

O presente estudo foi do tipo transversal, com um total de 226 amostras coletadas de bovinos de diferentes raças, criados em propriedades leiteiras sob sistemas de produção extensivo e semi-intensivo, com idades variando de 45 dias a 13 anos. Amostras de sangue foram coletadas de animais de ambos os sexos por punção das veias coccígea ou mamária utilizando o sistema Vacutainer®. As amostras foram acondicionadas em tubos de 4 mL contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para as análises hematológicas e moleculares, e em tubos sem anticoagulante para a análise sorológica. Após a coleta, os tubos foram identificados e acondicionados em recipiente térmico contendo gelo reciclável, sendo mantidos sob refrigeração até o processamento laboratorial. Os tubos sem anticoagulante foram centrifugados a 3.000 rpm por cinco minutos, a 22 °C, para obtenção do soro destinado aos testes sorológicos.

As propriedades participantes relataram o uso regular de acaricidas para o controle de *R. microplus*, porém não foi realizada a quantificação dos níveis de infestação dos animais no momento da coleta das amostras.

2.3 Determinação do volume globular e detecção de hemoparasitos em esfregaços sanguíneos

Alíquotas de sangue total foram utilizadas para determinar o volume globular (VG) por meio da técnica do microhematócrito, conforme descrito anteriormente [12], e para a preparação de esfregaços sanguíneos, que foram corados utilizando um método de coloração rápida (Diff-Quick®) para a detecção de *A. marginale* e *Babesia* spp. Cada lâmina foi examinada utilizando um microscópio óptico L2000-b-pl (Laborcare®) com aumento de 1000× (imersão em óleo), sendo avaliados 100 campos por lâmina. A análise das imagens foi realizada por um observador experiente, sem conhecimento prévio dos resultados moleculares e sorológicos.

2.4 Análise sorológica

A detecção de IgG contra *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* foi realizada por meio de ELISA indireto. O ensaio para A. marginale seguiu o protocolo descrito por Silva [13], enquanto os ensaios para *B. bigemina* e *B. bovis* foram conduzidos conforme descrito por Machado et al. [14]. Resumidamente, placas de microtitulação (Corning®) foram sensibilizadas com 100 µL por poço de antígeno diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6), em concentração final de 10 µg/mL. Os poços-controle receberam 100 µL de tampão carbonato-bicarbonato sem antígeno. As placas foram vedadas e incubadas durante a noite a 4°C em câmara úmida. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05 % de Tween 20 (PBS-Tween; pH 7,2). O bloqueio foi realizado com PBS-Tween suplementado com 6 % de leite em pó desnatado, seguido de incubação a 37°C por 90 min (*A. marginale*) ou 60 min (*Babesia* spp.).

Os soros bovinos foram diluídos a 1:200 (*A. marginale*) ou 1:400 (*Babesia* spp.) em PBS-Tween contendo 5 % do agente bloqueador e adicionados em duplicata (100 µL por poço). As placas foram incubadas a 37°C por 90 min e novamente lavadas conforme descrito anteriormente. Em seguida, foi adicionado a cada poço IgG anti-bovina conjugada à fosfatase alcalina (Sigma Chemical Co.), diluída a 1:25.000 (*A. marginale*) ou 1:10.000 (*Babesia* spp.), seguida de incubação a 37°C por 90 min. Após a lavagem, o substrato p-nitrofenil fosfato (pNPP) foi adicionado a cada poço, e as placas foram incubadas no escuro por 30–40 min em temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 405 nm utilizando um leitor de micro-ELISA (B.T.-100; Embrabio, São Paulo, Brasil). O valor de corte dos ensaios foi determinado com base na média da densidade óptica (DO) do controle negativo, acrescida de um desvio-padrão ajustado por um fator derivado da distribuição t de Student, conforme descrito por Frey et al. [15]. Esse fator depende do número de controles negativos (n) e do nível de confiança adotado. O ponto de corte foi calculado

utilizando a seguinte expressão: $\bar{X}$ + DP × √(t / n), em que $\bar{X}$ corresponde à média da DO dos soros-controle negativos, DP ao desvio-padrão das leituras, t ao valor da distribuição t de Student correspondente ao nível de confiança e ao número de controles negativos, e n ao número de controles negativos incluídos. Para classificar os animais como sorologicamente positivos ou negativos, os valores de DO foram convertidos em uma porcentagem em relação ao valor de corte de cada placa utilizando a fórmula: DO × 100 / ponto de corte.

2.5 Análise molecular

A extração de DNA a partir de amostras de sangue total foi realizada utilizando uma adaptação do método de fenol-clorofórmio, conforme descrito por Sambrook [16]. Após a extração, as amostras de DNA total foram quantificadas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®). As amostras de DNA foram padronizadas para uma concentração final de 50 ng/µL e armazenadas em alíquotas de 100 µL a −20°C para posteriores análises moleculares.

A detecção molecular de *A. marginale* foi realizada por meio da técnica de PCR semi-nested, tendo como alvo o gene *msp5*, conforme descrito por Singh et al. [17]. A PCR nested foi empregada para amplificar fragmentos dos genes *sbp-4* e *rap-1a* de *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente, seguindo a metodologia descrita por Terkawi et al. [18]. Os iniciadores utilizados em cada caso, bem como os tamanhos dos fragmentos amplificados e as temperaturas de anelamento, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos conjuntos de iniciadores específicos utilizados para amplificar os genes *msp5*, *sbp-4* e *rap-1a* de *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente.

Genes	Ensaio	Iniciadores de oligonucleotídeos	Tamanho produto	Temperatura anelamento (ºC)
msp5	PCR	5'- GCATAGCCTCCGCGTCTTTC-3' 5'–TCCTCGCCTTGGCCCTCAGA-3'	457 bp	58ºC
	snPCR	5'-TACACGTGCCCTACCGAGTTA-3' 5'–TCCTCGCCTTGGCCCTCAGA-3'	344 bp	58ºC
sbp-4	PCR	5'-AGTTGTTGGAGGAGGCTAAT-3' 5'-TCCTTCTCGGCGTCCTTTTC-3'	907 bp	55ºC
	nPCR	5'-GAAATCCCTGTTCCAGAG-3' 5'-TCGTTGATAACACTGCAA-3'	503 bp	55ºC
rap-1a	PCR	5'-GAGTCTGCCAAATCCTTAC-3' 5'-TCCTCTACAGCTGCTTCG-3'	879 bp	55ºC
	nPCR	5'-AGCTTGCTTTCACAACTCGCC-3' 5'-TTGGTGCTTTGACCGACGACAT-3'	412 bp	55ºC

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; snPCR: semi-nested PCR; nPCR: nested PCR; bp: pares de base.

A reação para detecção de *A. marginale* foi preparada em volume final de 25 µL, contendo água ultrapura (q.s.p.), tampão de reação na concentração final de 1X, $MgCl_2$ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM), iniciadores forward e reverse (0,4 µM cada) e Taq DNA polimerase (1 U, Promega®). As condições de ciclagem para a PCR primária e a snPCR consistiram em uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 58°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, com uma extensão final a 72°C por 10 min.

A reação para detecção de *B. bigemina* também foi preparada em volume final de 25 µL, contendo água ultrapura (q.s.p.), tampão de reação na concentração final de 1X, $MgCl_2$ (2,5 mM), dNTPs (0,2 mM), iniciadores forward e reverse (0,8 µM cada) e Taq DNA polimerase (1 U). As condições de ciclagem incluíram uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min e 30 s, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s e extensão a 72°C por 30 s, com uma extensão final a 72°C por 5 min.

A reação para *B. bovis* também foi preparada em volume final de 25 µL, contendo os reagentes nas mesmas concentrações utilizadas para a reação de detecção de *B. bigemina*. O protocolo de ciclagem compreendeu uma desnaturação inicial a 94°C por 4 min e 30 s, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s e extensão a 72°C por 30 s, com uma extensão final a 72°C por 7 min.

Em cada ensaio foram incluídos um controle positivo e dois controles negativos (água ultrapura, HyPure™ Molecular Biology). Os controles positivos foram obtidos a partir de amostras de sangue coletadas de bovinos naturalmente infectados do município de Seropédica (Rio de Janeiro, Brasil). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®) a 75 V (5 V/cm) durante 45 min em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados utilizando um transiluminador de luz ultravioleta (L-PIX Sti, Loccus).

2.6 Análise estatística

O teste do qui-quadrado foi utilizado para comparar os resultados dos testes diagnósticos e das demais variáveis consideradas, sendo adotado $p < 0,05$ como nível de significância estatística. As análises foram realizadas utilizando o R Core Team (2023) e o BioEstat® [19]. As idades foram categorizadas em até um ano, entre um e quatro anos e acima de quatro anos. Proporções foram utilizadas para analisar a idade, enquanto as demais variáveis foram analisadas por meio de frequências relativas.

3. Resultados

Durante as visitas às oito propriedades participantes, foi observada a presença de carrapatos *R. microplus* nos rebanhos amostrados, porém não foi realizada a quantificação da infestação nem a classificação do grau de parasitismo. As frequências de detecção dos patógenos variaram de acordo com a técnica diagnóstica empregada. Nos esfregaços sanguíneos, *A. marginale* foi identificada em 97 dos 226 animais (42,9 %), enquanto estruturas compatíveis com *Babesia* spp. foram observadas em apenas 2 das 226 amostras (0,88 %). Anticorpos contra *B. bovis* foram detectados por ELISA indireto em 150 das 226 amostras (66,4 %) de bovinos, enquanto anticorpos contra *B. bigemina* foram detectados em 63 das 226 amostras (27,9 %) e contra *A. marginale* em 60 das 226 amostras (26,5 %). Por sua vez, a snPCR revelou positividade para *A. marginale* em 166 das 226 amostras (73,5 %), para *B. bigemina* em 79 das 226 amostras (35,0 %) e para *B. bovis* em 63 das 226 amostras (27,9 %).

Foram observadas diferenças significativas na frequência de resultados positivos para cada patógeno de acordo com a técnica diagnóstica empregada ($p < 0,05$). A frequência de infecção por *A. marginale* foi significativamente maior do que as observadas para *Babesia* spp., de acordo com os resultados dos esfregaços sanguíneos e da snPCR, enquanto a maior frequência de infecção correspondeu a *B. bovis*, de acordo com os resultados do ELISA indireto.

Tabela 2. Número de amostras positivas para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* discriminadas de acordo com a técnica de análise.

Agente	Esfregaço Sanguíneo (n=226)	ELISAi (n=226)	snPCR/ nPCR (n=226)
Babesia bovis	2 (0,88 %)[a]	150 (66,4 %)[a]	63 (27,9 %)[a]
Babesia bigemina	2 (0,88 %)[a]	63 (27,9 %)[b]	79 (35,0 %)[a]
Anaplasma marginale	97 (42,9 %)[b]	60 (26,5 %)[b]	166 (73,5 %)[b]

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05).

Anaplasma marginale apresentou a maior frequência de infecção em todos os grupos etários avaliados, com valores significativamente superiores aos observados para *Babesia* spp. (p < 0,05). Também foram observadas variações entre os grupos etários para os três patógenos, com as maiores porcentagens de infecção observadas em animais com um ano de idade ou menos, e diferenças significativas no grau de redução entre as demais categorias etárias (Tabela 3).

Tabela 3. Número de amostras positivas para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* analisadas por técnicas moleculares, discriminadas de acordo com a idade.

Agente	≤ 1 ano (n=93)	> 1 a 4 anos (n=65)	> 4 anos (n=68)	Total
Babesia bovis	36 (38,7 %)[a;A]	17 (26,2 %)[a;B]	10 (14,7 %)[a;B]	63
Babesia bigemina	41 (44,1 %)[a;A]	25 (38,5 %)[a;A]	13 (28,9 %)[b;B]	79
Anaplasma marginale	81 (87,1 %)[b;A]	40 (61,5 %)[b;B]	45 (66,2 %)[c;B]	166

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05).

O volume globular dos 226 animais avaliados variou de 14 a 49 %, com média de 30 ± 4,2 %. Vinte e três amostras (10,2 %) apresentaram valores abaixo do intervalo de referência para a espécie (<24 %) [20]. Entre esses animais, *A. marginale* foi o patógeno mais frequentemente presente, sendo detectado em 18 animais (78,3 %), seguido por *B. bovis* em 7 (30,4 %) e *B. bigemina* em 4 (17,4 %).

Quando os animais anêmicos foram estratificados por grupo etário, *A. marginale* foi o patógeno mais frequentemente detectado em todas as categorias. Entre os animais com um ano de idade ou menos, todos os indivíduos anêmicos foram positivos para *A. marginale* (12/12, 100 %), enquanto frequências menores foram observadas nos animais entre um e quatro anos (3/6, 50 %) e naqueles com idade superior a quatro anos (3/5, 60 %). Para *B. bovis*, as frequências de infecção foram de 25 % (3/12), 33,3 % (2/6) e 40 % (2/5) nos respectivos grupos etários. *B. bigemina* apresentou as menores frequências de detecção, com 16,7 % (2/12), 16,7 % (1/6) e 20 % (1/5) de animais positivos nas respectivas categorias etárias (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição dos animais anêmicos de acordo com a idade e a positividade para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* determinada por snPCR/nPCR.

Faixa etária	n*	*A. marginale*	*B. bovis*	*B. bigemina*
≤ 1 ano	12	12 (100 %)[a]	3 (25 %)[a]	2 (16,7 %)[a]
> 1 a 4 anos	6	3 (50 %)[b]	2 (33,3 %)[a]	1 (16,7 %)[a]
> 4 anos	5	3 (60 %)[b]	2 (40 %)[a]	1 (20 %)[a]
Total	23	18 (78,3 %)	7 (30,4 %)	4 (17,4 %)

*n: número de animais anêmicos. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05).

De acordo com os resultados das técnicas moleculares, 28 animais (12,4 %) apresentaram coinfecção pelos três patógenos analisados. Coinfecção dupla por *B. bovis* e *B. bigemina* foi observada em 33 animais (14,6 %), enquanto 48 (21,2 %) apresentaram coinfecção por *B. bovis* e *A. marginale*, e 66 (29,2 %) por *B. bigemina* e *A. marginale*.

4. Discussão

O presente estudo avaliou a ocorrência de infecções por *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* em bovinos do município de Vassouras utilizando ensaios parasitológicos, sorológicos e moleculares. A aplicação de múltiplas técnicas permitiu a avaliação de diferentes aspectos da exposição e da infecção pelos patógenos da TPB.

O fato de o exame de esfregaço sanguíneo ter detectado infecção por *A. marginale* em menos de 50 % dos animais e por *B. bigemina* ou *B. bovis* apenas em casos raros reflete a baixa sensibilidade desse método, especialmente para infecções subclínicas ou aquelas com baixa parasitemia [21, 22]. A sorologia indicou alta soropositividade, particularmente para *B. bovis* (66,4 %), demonstrando elevados níveis de exposição ao parasito. Portanto, as discrepâncias observadas entre os métodos eram esperadas e devem ser interpretadas considerando os diferentes estágios da infecção e a resposta imunológica do hospedeiro.

Comparando os resultados com estudos realizados em outras regiões do estado do Rio de Janeiro, a circulação desses patógenos parece ser consistente. Em bovinos da mesorregião Norte Fluminense, a soroprevalência de *B. bovis* foi relatada como sendo de 90,98 % de acordo com ELISA indireto, enquanto a infecção por *A. marginale* apresentou altas frequências em todas as categorias etárias, com tendência de redução com o aumento da idade [23]. Em Seropédica e áreas adjacentes, a prevalência de *B. bovis* e *B. bigemina* foi aproximadamente de 30–35 % por PCR e de 70–75 % por ELISA, confirmando que os testes sorológicos são mais adequados para detectar exposição prévia, enquanto as técnicas moleculares identificam a presença de DNA do patógeno no momento da coleta [24]. No presente estudo, esse padrão foi observado para *B. bovis*, cuja frequência determinada por métodos moleculares foi inferior à obtida por testes sorológicos. Entretanto, o padrão oposto foi observado para *B. bigemina* e *A. marginale.*

Uma menor frequência de infecção por *A. marginale* determinada por técnicas sorológicas em comparação às técnicas moleculares não é um achado comum, mas já foi descrita anteriormente [25]. Esse padrão pode estar relacionado ao estágio da infecção no momento da coleta, uma vez que a PCR detecta DNA bacteriano circulante e, portanto, é capaz de identificar infecções agudas e subclínicas, incluindo animais com baixos níveis de bacteremia [26], que podem ainda não ter desenvolvido uma resposta humoral detectável no momento da amostragem. Em contraste, os ensaios sorológicos dependem da produção de anticorpos pelo hospedeiro, que pode estar atrasada durante os estágios iniciais da infecção ou permanecer abaixo do limiar de detecção em animais com infecção leve. Além disso, a variação antigênica entre cepas de *A. marginale* circulantes em diferentes regiões geográficas pode reduzir a sensibilidade dos testes sorológicos baseados em antígenos heterólogos ou não locais [27]. Variações na capacidade de resposta imunológica entre hospedeiros individuais, bem como possíveis limitações na sensibilidade dos ensaios e nos valores de ponto de corte, podem contribuir adicionalmente para a redução da detecção sorológica. No entanto, também foi observado que aproximadamente 49 % dos animais positivos para *A. marginale* tinham menos de 12 meses de idade. Essa distribuição etária pode estar associada à proteção conferida pelos anticorpos colostrais e à menor exposição aos vetores em animais jovens, que possuem menor contato com carrapatos em comparação aos animais mais velhos [25].

A análise molecular revelou a presença de coinfecções triplas e duplas em proporções relevantes, indicando que a exposição simultânea a múltiplos hemoparasitos é um fenômeno epidemiológico importante na região. Apesar disso, não foram observados surtos clínicos, sugerindo que a circulação desses agentes ocorre predominantemente de forma subclínica.

Foi observado que animais mais jovens apresentaram maiores frequências de infecção para os três patógenos determinadas pelas técnicas moleculares, indicando que a imunidade adquirida com a idade reduz a suscetibilidade. Esse padrão é consistente com a epidemiologia da TPB em áreas endêmicas, nas quais animais jovens apresentam maior risco de infecção clínica, enquanto infecções subclínicas são mais comuns em adultos [28, 29].

Embora os genes *msp5*, *sbp-4* e *rap-1a* tenham sido amplamente adotados e validados para o diagnóstico molecular de infecções por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente, eles representam alvos de cópia única ou de baixo número de cópias. Portanto, a sensibilidade diagnóstica pode ser inferior à obtida utilizando genes com múltiplas cópias no genoma [30, 31, 32, 33]. Dessa forma, é possível que a ocorrência desses agentes tenha sido subestimada, sendo recomendado o uso de alvos com múltiplas cópias em estudos futuros para aumentar a sensibilidade de detecção.

Entre os animais anêmicos, a maior proporção estava infectada por *A. marginale*, sugerindo um maior impacto hematológico dessa riquétsia, embora as infecções tenham sido frequentemente subclínicas. A anemia extravascular observada pode ter resultado tanto da destruição de eritrócitos parasitados quanto de mecanismos imunológicos que afetam eritrócitos não parasitados, explicando a maior frequência de anemia associada a *A. marginale* [29, 34].

Os resultados destacam a importância da integração de diferentes técnicas diagnósticas para compreender a epidemiologia da TPB, uma vez que ensaios parasitológicos, sorológicos e moleculares fornecem informações complementares sobre infecção ativa, exposição prévia e impacto clínico. Embora a circulação contínua de *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* em Vassouras-RJ, tenha sido confirmada, não é possível caracterizar a estabilidade enzoótica com base nos resultados do presente estudo. Para uma avaliação mais robusta, seria necessário incorporar dados longitudinais, registros de surtos, mensurações da intensidade de infestação por carrapatos e informações sobre manejo dos rebanhos e práticas de controle de vetores [35], a fim de compreender melhor o equilíbrio entre exposição, resistência e manifestações clínicas dos hemoparasitos no rebanho.

Apesar da relevância epidemiológica dos achados, algumas limitações devem ser reconhecidas. A estratégia de amostragem foi baseada em conveniência, sem um cálculo formal para definir o número de propriedades amostradas ou o número de animais amostrados por propriedade, o que pode limitar a representatividade dos resultados. Além disso, nenhum controle endógeno foi incluído nas reações moleculares; entretanto, a qualidade e a concentração do DNA foram avaliadas por espectrofotometria. Embora a presença de carrapatos tenha sido observada nos animais avaliados, a ausência de uma quantificação padronizada da infestação impossibilitou a análise da associação entre o nível de infestação e a presença dos patógenos da TPB bovina.

5. Conclusão

Os resultados demonstram a circulação ativa de hemoparasitos no município de Vassouras, no estado do Rio de Janeiro, com predominância de *A. marginale* (73,5 %), seguido por *B. bigemina* (35,0 %) e *B. bovis* (27,9 %). A PCR demonstrou maior sensibilidade diagnóstica em comparação ao exame de esfregaço sanguíneo, particularmente para a detecção de *Babesia* spp. Esses achados reforçam a importância do monitoramento contínuo e do controle de vetores na região.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Declaração de disponibilidade de dados

O conjunto completo de dados que suporta os resultados deste estudo está disponível mediante solicitação ao autor correspondente.

Contribuições do autor

Conceituação: Chagas, J. D. R., Baêta, B. A.; Curadoria dos dados: Chagas, J. D. R.; Análise formal: Cunha, N. C.; Investigação: Chagas, J. D. R., Cordeiro, M. D., Fontes, P. M. A., Araújo, I. M., Moraes, R. F. F., Roier, E. C. R., Cunha, N. C., Baêta, B. A.; Metodologia: Chagas, J. D. R., Baêta, B. A.; Aquisição de financiamento: Baêta, B. A.; Administração do projeto: Baêta, B. A.; Recursos: Cordeiro, M. D., Baêta, B. A.; Supervisão: Baêta, B. A.; Redação – rascunho original: Chagas, J. D. R.; Redação – revisão e edição: Cordeiro, M. D., Araújo, I. M., Moraes, R. F. F., Roier, E. C. R., Cunha, N. C., Baêta, B. A.

Declaração de uso de IA generativa

Durante a elaboração deste trabalho, os autores utilizaram o ChatGPT (versão 5.3) para correção gramatical. Os autores revisaram e editaram o texto gerado conforme necessário e assumem total responsabilidade pelo conteúdo do artigo publicado.

Referências

1.Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, Leon AAP, Pereira JB, Villela HS. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Braz. J. Vet. Parasitol. 2014;23(2):150–156. Disponível em: https://doi.org/10.1590/s1984-29612014042

2.Shebish E, Vemulapalli R, Oset C. Prevalence and molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from Puntarenas Province, Costa Rica. Vet. Parasitol. 2012;188:164–167. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.009

3.Vidotto O, Marana ERM. Anaplasmose bovina: aspectos epidemiológicos, clínicos e controle. Semina: Ciênc. Agrár. 1999;20(1):98–106. Disponível em: https://doi.org/10.5433/1679-0359.1999v20n1p98

4.Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet. Parasitol. 2010;167(2–4):95–107. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012

5. Kessler RH. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. Pesqui. Vet. Bras. 2001;21(4):177–179. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0100-736X2001000400009

6. Suarez CE, Noh S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. Vet. Parasitol. 2011;180(1–2):109–125. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.032

7. Silva JB, Gonçalves LR, Varani AM, Andre MR, Machado RZ. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* studied longitudinally under natural transmission conditions in Rio de Janeiro, Brazil. Ticks Tick Borne Dis. 2015;6(4):499–507. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.04.002

8. Costa SCL, Magalhães VCS, Oliveira UV, Carvalho FS, Almeida CP, Machado RZ. Transplacental transmission of bovine tick-borne pathogens: Frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic stability in the northeast of Brazil. Ticks Tick Borne Dis. 2016;7:270–275. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.11.001

9. Gonçalves PM. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. Ciênc. Rural. 2000;30(1):187–194. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000100030

10. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): Recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. Parasitology. 2004;129:285–300. Disponível em: https://doi.org/10.1017/s0031182003004700

11. Al-Hosary AAT. Comparison between conventional and molecular methods for diagnosis of bovine babesiosis (Babesia bovis infection) in tick-infested cattle in Upper Egypt. J. Parasitol. Dis. 2017;41(1):243–246. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s12639-016-0785-2

12. Jain NC. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia: Lea and Febiger; 1993. p. 76–250.

13. Silva JB da, Fonseca AH da. Análise dos fatores de risco relacionados à resposta imune humoral anti-*Anaplasma marginale* em vacas de leite. Semina: Ciênc Agrár. 2013;34(2):777–784. https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n2p777

14. Machado RZ, Montassier HJ, Pinto AA, Lemos EG, Machado MR, Valadão IF, Barci LG, Malheiros EB. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. Vet. Parasitol. 1997;71(1):17–26. Disponível em: https://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00003-4

15. Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. J. Immunol. Methods. 1998;221(1–2):35–41. Disponível em: https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00170-7

16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. Volume 1.

17. Singh, H., Haque, M., Singh, N. K., & Rath, S. S. (2012). Molecular detection of *Anaplasma marginale* infection in carrier cattle. Ticks Tick Borne Dis. 2012; 3(1): 55-58. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.10.002

18. Terkawi MA, Huyen NX, Shinuo C, Inpankaew T, Maklon K, Aboulaila M, et al. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. Vet. Parasitol. 2011;178(3–4):201–207. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.041

19. Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AS. Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém: Mamirauá; 2007.

20. Weiss DJ, Wardrop KJ, eds. Schalm's Veterinary Hematology. 6th ed. Hoboken, NJ: Wiley Blackwell; 2010.

21. Ganguly A, Maharana BR, Ganguly I, Kumar A, Potliya S, Arora D, Bisla RS. Molecular diagnosis and haemato-biochemical changes in *Anaplasma marginale* infected dairy cattle. Indian J. Anim. Sci. 2018;88(9):989–993. Disponível em: https://doi.org/10.56093/ijans.v88i9.83538

22. Das D, et al. Naturally occurring *Anaplasma marginale* infection in cattle: Molecular prevalence and associated risk factors, haemato-biochemical alterations, oxidant/antioxidant status and serum trace mineral levels. Microb. Pathog. 2022;167:105575. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105575

23. Soares CO, Souza JCP, Madruga CR, Madureira RC, Massard CL, Fonseca AH. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. Pesqui. Vet. Bras. 2000;20(2):75–79. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0100-736X2000000200004

24. Silva JB, Santos PN, Fonseca AH. Molecular and serological detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from Rio de Janeiro, Brazil. Semina: Ciências Agrárias. 2014;35(6):3139-3146. Disponível em: https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n6p3139

25. Sharma A, Singla LD, Kaur P, Bal MS. PCR and ELISA vis-à-vis microscopy for detection of bovine anaplasmosis: a study on associated risk of an upcoming problem in North India. Sci. World J. 2015;2015:352519. https://doi.org/10.1155/2015/352519

26. Bahia M, Silva LTD, Silva BMD, Cordeiro MD, Guterres A, Silva CBD, Silva JBD, Fonseca AH. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves with anaplasmosis on farms in Minas Gerais, Brazil. Ticks Tick Borne Dis. 2021;12(1):101552. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101552

27. Ramos CA, Araújo FR, Souza II, Guedes DS Jr, Rangel HA, Farias TA, et al. Comparação entre diversos antígenos para o diagnóstico de *Anaplasma marginale* por ELISA. Pesq Vet Bras. 2010;30(1):37-41. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000100006

28. Aubry P, Geale DW. A review of bovine anaplasmosis. Transbound. Emerg. Dis. 2011;58:1–30. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x

29. De UK, et al. Correlations among *Anaplasma marginale* parasitemia and markers of oxidative stress in crossbred calves. Trop. Anim. Health Prod. 2012;44:385–388. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11250-011-9938-6

30. de la Fournière S, Paoletta MS, Guillemi EC, Sarmiento NF, Donati PA, Wilkowsky SE, et al. Development of highly sensitive one step-PCR tests for improved detection of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis*. Vet Parasitol. 2021;296:109493. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109493

31. Giglioti R, Vercesi Filho AE, Domingos AG, Silva SS, Cunha RC, Ibelli AMG, et al. Detection and quantification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* using different target genes. Res Vet Sci. 2024;168:105122. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.105122

32. Machado RZ, Teixeira MM, Rodrigues AC, André MR, Gonçalves LR, Barbosa da Silva J, Pereira CL. Molecular diagnosis and genetic diversity of tick-borne *Anaplasmataceae* agents infecting the African buffalo *Syncerus caffer* from Marromeu Reserve in Mozambique. Parasit Vectors. 2016;9:454. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1715-y

33. de Jesus Fernandes S, Matos CA, Freschi CR, de Souza Ramos IA, Machado RZ, André MR. Diversity of *Anaplasma* species in cattle in Mozambique. Ticks Tick Borne Dis. 2019;10(3):651-664. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.012

34. Esmaeilnejad B, Tavassoli M, Samiei A, Hajipour N, Imani-Baran A, Farhang-Pajuh F. Evaluation of oxidative stress and antioxidant status, serum trace mineral levels and cholinesterase activity in cattle infected with *Anaplasma marginale*. Microb. Pathog. 2018;123:402–409. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.039

35. Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK, Morton JM, Stear MJ. Is endemic stability of tick-borne diseases in cattle a useful concept? Trends Parasitol. 2012;28:85–89. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.12.002