

Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense¹

José Carlos P. Souza², Cleber O. Soares², Carlos L. Massard², Alessandra Scofield³
e Aivaldo H. Fonseca²

ABSTRACT.- Souza J.C.P., Soares C.O., Massard C.L., Scofield A. & Fonseca A.H. 2000. [Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in cattle in the "Norte Fluminense" mesoregion.] Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 20(3):97-101. Depto Parasitologia Animal, Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil.

Seroprevalence of antibodies against *Anaplasma marginale* was evaluated by the indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Sera samples from 532 bovines from nine municipalities in the "Norte Fluminense" mesoregion, Rio de Janeiro state, were analysed. The results showed that 485 (91.16%) were positive, of which 55.45% had a titre of 1:500, 22.18% of 1:1000, 6.77% of 1:2000, 3.01% of 1:4000, 1.50% of 1:8000, 0.94% of 1:16000, 0.75% of 1:32000, 0.56% of 1:64000, and 8.84% were negative. The prevalence analysis was done within three age groups: 1 to 3 years (n= 110), 3 to 6 years (n= 241) and > 6 years (n= 181), of which 91.82%, 92.95% and 88.95% were positive, respectively. According to the breed, 91.22% of beef cattle (n= 444) and 90.91% of dairy cattle (n= 88), were positive. Regarding the sex, 91.35% of the females (n= 497) and 88.57% of the males (n= 35), were positive. There were no significant differences between the age groups, breeding types and the sexes (P > 0.05); and between the prevalence in the municipalities (P > 0.000). The seroprevalence showed that the region has to be considered enzootically stable, and the infection by *A. marginale* in this area is high and homogeneous.

INDEX TERMS: Seroepidemiology, *Anaplasma marginale*, bovine anaplasmosis, enzyme immunoassay, "Norte Fluminense" mesoregion, Brazil.

RESUMO.- Avaliou-se a soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos de nove municípios na mesorregião Norte Fluminense do estado do Rio de Janeiro através do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto. 532 amostras de soro de bovinos foram analisadas; dos quais, 497 eram fêmeas e 35 eram machos; e destes, 444 animais com aptidão zootécnica para corte e 88 com aptidão para leite. A avaliação sorológica revelou que 485 (91,16%) foram positivas, dos quais: 55,45% com título de 1:500, 22,18% com título de 1:1000, 6,77% com título de 1:2000, 3,01% com título de 1:4000, 1,50% com título de 1:8000, 0,94% com título de 1:16000, 0,75% com título de 1:32000, 0,56% com título de

1:64000 e 8,84% foram negativos. A análise da prevalência segundo a faixa etária foi realizada dividindo-se em três grupos etários: 1 a 3 anos (n= 110), 3 a 6 anos (n= 241) e > 6 anos (n= 181), onde 91,82%, 92,95% e 88,95% dos animais foram positivos, respectivamente. Segundo a aptidão zootécnica, 91,22% dos bovinos com aptidão para corte e 90,91% dos bovinos com aptidão para leite foram positivos. Em relação ao sexo, 91,35% das fêmeas e 88,57% dos machos foram positivos. Não houve diferença significativa (P>0,05) entre os grupos etários, entre os sexos e entre as aptidões zootécnicas. A prevalência entre os municípios não diferiu significativamente (P>0,000), demonstrando que a infecção por *A. marginale* em bovinos é alta e homogênea entre os municípios. A mesorregião estudada foi caracterizada como uma área de estabilidade enzoótica.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Seroepidemiologia, *Anaplasma marginale*, anaplasmosse bovina, ensaio imunoenzimático, mesorregião Norte Fluminense, Brasil.

¹Aceito para publicação em 11 de fevereiro de 2000.

²Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Km 47, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: csoares@ufrj.br

³Acadêmica de Medicina Veterinária da UFRRJ, Bolsista de Iniciação Científica / CNPq.

INTRODUÇÃO

A anaplasmosse bovina é uma enfermidade infecciosa causada por rickettsia intraeritrocítica do gênero *Anaplasma*. Duas espécies deste gênero podem acometer os bovinos: *Anaplasma centrale* Theiler, 1911, agente da anaplasmosse benigna, com pouca importância e pouca distribuição e; *Anaplasma marginale* Theiler, 1910, rickettsia responsável pela doença maligna, com ampla distribuição geográfica (Fonseca & Braga 1924, Kessler et al. 1992).

A. marginale determina uma doença severa, devido à rápida multiplicação deste agente e, por determinar massiva hemocaterese, a bile se torna espessa, grumosa, de cor amarelada e os tecidos icterícos (Fonseca & Braga 1924, Tokarnia & Döbereiner 1962). Esta enfermidade é também conhecida como "mal da bile". A transmissão deste hematozoário se dá mecanicamente através de dípteros hematófagos (tabanídeos, moscas hematófagas e mosquitos), além da transmissão por fômites. O carrapato *Boophilus microplus* transmite-o biologicamente de forma transestadial e intra-estadial (Ribeiro 1991).

A anaplasmosse ocorre tanto em países de clima tropical e sub-tropical, quanto em países de clima temperado; e tem grande importância nas áreas de instabilidade enzoótica como nas áreas de estabilidade, devido à introdução de animais provenientes de áreas livres de carrapato (Kessler et al. 1987, Dalglish et al. 1990).

Na maioria das regiões do Brasil a situação epidemiológica da anaplasmosse bovina é de estabilidade enzoótica (Ribeiro & Reis 1981a, Dalagnol et al. 1995, Araújo et al. 1998). Poucas são as áreas caracterizadas como de instabilidade enzoótica; como é a situação do Sertão de Sergipe (Oliveira et al. 1992) e o extremo Sul do Rio Grande do Sul (Artilles et al. 1995). Nestas áreas os fatores ecológicos e climáticos não favorecem ao desenvolvimento de *B. microplus* e de dípteros hematófagos, transmissores de *A. marginale*.

Para se conhecer a situação epidemiológica de determinada região, faz-se necessário o auxílio de provas sorológicas. Dentre as diversas provas, o ensaio imunoenzimático de adsorção (ELISA) é o método mais apropriado para se trabalhar com grande amostragem, além de ser um dos mais seguros e eficazes (Madruga et al. 1996, Vidotto et al. 1997, Araújo et al. 1998).

Em virtude do não conhecimento da condição epidemiológica da anaplasmosse no estado do Rio de Janeiro; objetivou-se investigar a soroprevalência de *A. marginale* em bovinos na mesoregião Norte Fluminense.

MATERIAL E MÉTODOS

Região estudada e amostragem

O estudo foi realizado com amostras de soro de bovinos de nove municípios da mesoregião Norte Fluminense do estado do Rio de Janeiro, de acordo com a divisão político-administrativa da Fundação CIDE (1997).

Coletou-se, assepticamente, o sangue de 532 animais puros *Bos indicus* ou mestiço *B. indicus* x *B. taurus*. A coleta e a amostragem dos soros foram realizadas segundo metodologia descrita, em estudos anteriores, com *Babesia bigemina*, para a mesma mesoregião do presente trabalho (Souza et al. 2000).

Divisão por grupos

As 532 amostras de soro coletadas estão distribuídas entre nove municípios: Campos (n= 186), Macaé (n= 91), São Fidélis (n= 55), Carapebus (n= 10), Quissamã (n= 50), Conceição de Macabú (n= 27), São Francisco de Itabapoana (n= 69), Cardoso Moreira (n= 25) e São João da Barra (n= 19). Os animais estudados foram divididos por grupos; quanto à faixa etária: 1 a 3 anos (n= 110), 3 a 6 anos (n= 241) e > 6 anos (n= 181); quanto ao sexo: fêmeas (n= 497) e machos (n= 35) e quanto à aptidão zootécnica: animais com aptidão zootécnica para corte (n= 444) e animais com aptidão zootécnica para leite (n= 88).

Ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto

Procedeu-se o ensaio ELISA indireto para detecção de imunoglobulinas do isotipo IgG anti *A. marginale*. Na obtenção de antígeno utilizou-se *A. marginale* proveniente de sangue de bezerras com parasitemia de 80,0% (Kessler et al. 1987). Microplacas de poliestireno com 96 orifícios foram sensibilizadas com extrato total antigênico de *A. marginale* obtido segundo metodologia descrita por Madruga et al. (1996), diluído em tampão carbonato pH 9,6. Os soros controles negativo e positivo, bem como os soros testes foram diluídos à 1:500 em tampão salino fosfatado com Tween 20 a 0,05% (PBST) pH 7,4. Foi utilizado como conjugado IgG de coelho anti IgG bovina marcada com fosfatase alcalina (Sigma Chemical) diluído em PBST pH 7,4. Utilizou-se como substrato-cromógeno para-nitrofenil fosfato (Sigma Chemical) diluído em tampão glicina pH 10,5. A leitura do ensaio foi realizada em espectrofotômetro multicanal para microplacas de 96 orifícios (Bio Rad Laboratories, model 550 Microplate Reader) ao comprimento de onda de 405nm.

Análise estatística

Para o ELISA a linha de corte (*cut-off*) foi estabelecida com grau de confiança de 99,99%, o qual é determinado pela média mais três vezes o desvio padrão da densidade óptica dos soros controles negativos. Realizou-se a análise estatística dos dados utilizando os testes de Fisher e Qui-quadrado (χ^2) com P variando de 0,000 a 0,05.

RESULTADOS

A análise das 532 amostras de soro demonstrou que 485 (91,16%) foram reagentes positivas ao ELISA indireto, dos quais: 55,45% com título de 1:500, 22,18% com título de 1:1000, 6,77% com título 1:2000, 3,01% com título de 1:4000, 1,50% com título de 1:8000, 0,94% com título de 1:16000, 0,75% com título de 1:32000, 0,56% com título de 1:64000 e 8,84% foram negativos (Quadro 1).

Quadro 1. Prevalência sorológica de anticorpos anti *Anaplasma marginale* em bovinos (n= 532) da mesoregião Norte Fluminense, determinada pelo ELISA indireto

Título	Positivos (n)	Prevalência		
		Relativa	Absoluta	
1:500	295	60,83%	55,45%	-
1:1000	118	24,33%	22,18%	-
1:2000	36	7,42%	6,77%	-
1:4000	16	3,30%	3,01%	-
1:8000	8	1,65%	1,50%	-
1:16000	5	1,03%	0,94%	-
1:32000	4	0,82%	0,75%	-
1:64000	3	0,62%	0,56%	-
Total positivos	485	100%	91,16% (485/532)	-
Total negativos	-	-	8,84%(47/532)	47

Quadro 2. Prevalência sorológica de anticorpos anti *Anaplasma marginale* em bovinos (n= 532), segundo a idade, da mesoregião Norte Fluminense

	Faixa etária (anos)					
	1 - 3 (n= 110)*		3 - 6 (n= 241)*		> 6 (n= 181)*	
	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta
Positivo	91,82% (101/110)	18,99% (101/532)	92,95% (224/241)	42,11% (224/532)	88,95% (161/181)	30,26% (161/532)
Negativo	8,18% (20/181)	1,69% (17/532)	7,05% (17/241)	3,19% (9/532)	11,05% (9/110)	3,76% (20/532)
Total	100% (110/110)	20,68% (110/532)	100% (241/241)	45,30% (241/532)	100% (181/181)	34,02% (181/532)

*Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as faixas etárias, segundo o teste χ^2 .

A análise da prevalência segundo a faixa etária, dividindo-se em três grupos: 1 a 3 anos, 3 a 6 anos e > 6 anos de idade; revelou que 91,82%, 92,95% e 88,95% dos animais foram positivos, respectivamente. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos etários, segundo o teste χ^2 (Quadro 2).

Quadro 3. Prevalência sorológica de anticorpos anti *Anaplasma marginale* em bovinos (n= 532), segundo a aptidão zootécnica, da mesoregião Norte Fluminense

	Aptidão zootécnica			
	Corte (n=444)*		Leite (n=88)*	
	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta
Positivo	91,22% (405/444)	76,13% (405/532)	90,91% (80/88)	15,04% (80/532)
Negativo	8,78% (39/444)	7,33% (39/532)	9,09% (8/88)	1,50% (8/532)
Total	100% (444/444)	83,46% (444/532)	100% (88/88)	16,54% (88/532)

*Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as aptidões zootécnicas, segundo o teste χ^2 e o teste de Fisher.

Quadro 4. Prevalência sorológica de anticorpos anti *Anaplasma marginale* em bovinos (n= 532), segundo o sexo, da mesoregião Norte Fluminense

	Sexo			
	Fêmea (n=497)*		Macho (n=35)*	
	Relativa	Absoluta	Relativa	Absoluta
Positivo	91,35% (454/497)	85,34% (454/532)	88,57% (31/35)	5,83% (31/532)
Negativo	8,65% (43/497)	8,08% (43/532)	11,43% (4/35)	0,75% (4/532)
Total	100% (497/497)	93,42% (497/532)	100% (35/35)	6,58% (35/532)

*Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os sexos, segundo o teste χ^2 e o teste de Fisher.

Para a aptidão zootécnica, a análise da soroprevalência encontrada foi de 91,22% dos bovinos com aptidão para corte e 90,91% dos bovinos com aptidão para leite. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as aptidões, pelo teste χ^2 e o teste de Fisher (Quadro 3).

Quanto a soroprevalência segundo o sexo, 91,35% das fêmeas e 88,57% dos machos foram positivos. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os sexos, pelo teste χ^2 e o teste de Fisher (Quadro 4).

Ao analisar a prevalência entre os nove municípios, observou-se não haver diferença significativa ($P > 0,000$), segundo o teste χ^2 . A soroprevalência de *A. marginale* para cada município foi de: Campos 94,62% (176), Macaé 91,21% (83), São Fidelis 85,45% (47), Carapebus 100% (10), Quissamã 96% (48), Conceição de Macabú 100% (27), São Francisco de Itabapoana 81,16% (56), Cardoso Moreira 96% (24) e São João da Barra 73,68% (14) (Fig.1).

DISCUSSÃO

A prevalência encontrada caracteriza a mesoregião estudada como uma área de estabilidade enzoótica para *A. marginale*. Esta situação é pertinente, pois a anaplasmose bovina é endêmica na maioria das regiões de clima tropical, sub-tropical e temperado do globo (Rogers et al. 1978, Payne & Scott 1982). A não observação de diferença estatística das prevalências entre os municípios, demonstrou que a infecção por *A. marginale* é alta e homogênea na mesoregião Norte Fluminense. Estas afirmativas são corroboradas pelo fato de esta rickettsia possuir diferentes meios de transmissão mecânica, além da transmissão biológica por *B. microplus* (Ribeiro 1991, Kessler et al. 1992).

As áreas de instabilidade enzoótica para *A. marginale*, no Brasil, são regiões onde os vetores deste agente não têm condições favoráveis para o seu desenvolvimento. Em um levantamento realizado no estado de Sergipe, sob as regiões climáticas árida, semi-árida, transição semi-árida e transição semi-úmida, foi observado a prevalência média de 16,30% para *A. marginale* (Oliveira et al. 1992). Outra área nesta condição é o extremo sul do país onde a prevalência para este hematozoário é de 64% (Artiles et al. 1995). Ambos os estudos utilizaram o teste do cartão (TC) na análise epidemiológica.

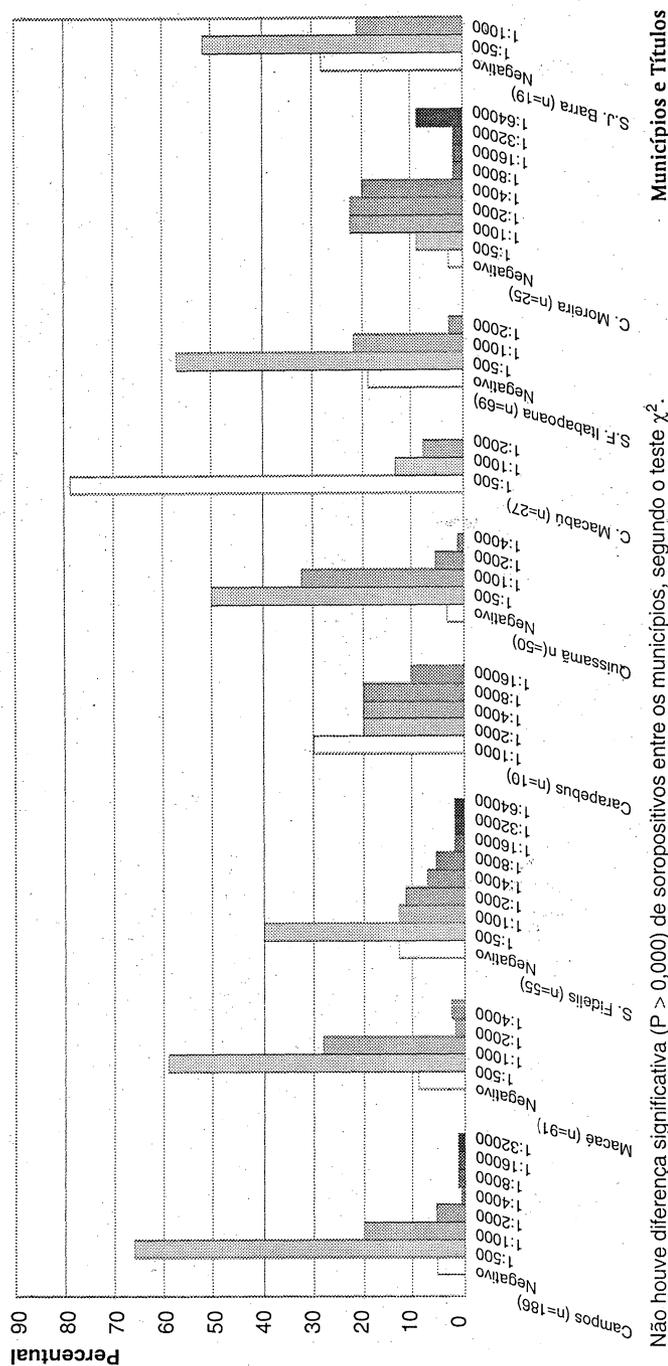


Fig. 1. Prevalência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* em bovinos (n = 532) da mesoregião Norte Fluminense. Distribuição segundo os municípios estudados.

Os estudos realizados em outras regiões demonstraram o predomínio da situação de estabilidade enzoótica. No estado de Minas Gerais a prevalência observada, pelo TC, para as regiões do Alto Paranaíba, Metalúrgica, Sul de Minas e Triângulo Mineiro, foi de 86,5%, 93,1%, 91,6% e 86,1%, respectivamente (Ribeiro & Reis 1981a). Enquanto para a região da Zona da Mata, deste estado, avaliada pela imunofluorescência indireta (IFI), foi de 81,1% (Ribeiro et al. 1984). Em Santa

Catarina, Dalagnol et al. (1995) observaram, pela IFI, que 86,0% de bovinos foram soropositivos.

Na microrregião de Londrina no Paraná foi verificado, pela IFI, a prevalência de 68,0% para a anaplasmosse (Vidotto et al. 1995). No entanto, em estudo posterior estes autores observaram, utilizando um ELISA competitivo, na mesma área o percentual de positivos de 87,5% (Vidotto et al. 1997); comprovando a superioridade do ELISA. Ao analisar 324 amostras de três microrregiões do estado da Bahia, observou-se que a prevalência pelo ELISA indireto (96,9%) não diferiu significativamente da resultado pela IFI (97,2%); embora, diferissem do teste de congutinação rápida (91,0%) (Araújo et al. 1998).

Não houve diferença estatística entre os grupos etários, aptidões zootécnicas e sexos, o que demonstra que a infecção por *A. marginale* nesta mesoregião é independente destes parâmetros. Ribeiro & Reis (1981a) e Madruga et al. (1985), também observaram que a prevalência de anticorpos anti *A. marginale* é independente do fator racial; e que a partir de quatro meses, independe da idade. Mesmo em condições de instabilidade enzoótica, o parâmetro idade não influencia na situação epidemiológica (Oliveira et al. 1992).

A soroprevalência observada no presente trabalho indica que os animais se infectam quando jovens e sofrem sucessivas reinfecções, mantendo o estado de portador e a imunidade. Muitos estudos comprovam que a resistência natural à anaplasmosse perdura por pouco tempo; em torno do 12º ao 60º dia de vida do bezerro (Ribeiro & Reis 1981b, Madruga et al. 1985), quando os níveis de anticorpos colostrais garantem proteção. A anaplasmosse é uma enfermidade frequente em bezerros no Brasil, mesmo em áreas de estabilidade enzoótica (Fonseca & Braga 1924, Tokarnia & Döbereiner 1962, Ribeiro & Reis 1981b, Oliveira et al. 1992).

A superioridade do ELISA demonstrada em diferentes pesquisas fortalece a utilização deste ensaio no presente estudo, onde este foi capaz de qualificar e quantificar anticorpos anti *A. marginale*.

REFERÊNCIAS

- Araújo F.R., Madruga C.R., Bastos P.A.S., Marques A.P.C. 1998. Frequência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 50(3): 243-246.
- Artiles J., Alves-Branco E.P.J., Martins J.R., Correa L.B. & Sapper M.F.M. 1995. Prevalências de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* no município de Bagé, RS. Revta Bras. Parasitol. Vet. 4(2, Supl.1): 179.
- CIDE, Fundação de Informação e Dados do Rio de Janeiro. 1997. Território, Rio de Janeiro. 80p.
- Dalagnol C.A., Martins E. & Madruga C.R. 1995. Prevalência de anticorpos contra *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* em bovinos de corte na região de clima Cfb. Revta Bras. Parasitol. Vet. 4(2, Supl.1): 220.
- Dalglish R.J., Jorgensen W.K. & De Vos A.J. 1990. Australian frozen vaccines for the control of babesiosis and anaplasmosis in cattle - A review. Trop. Anim. Hlth Prod. 22: 44-52.
- Fonseca A. & Braga A. 1924. Noções sobre a tristeza parasitária dos bovinos. Oficina Typográfica do Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro. 216p.
- Kessler R.H., Madruga C.R., Jesus E.F. & Semprebom D.V. 1987. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. Pesq. Agropec. Bras. 22: 747-752.

- Kessler R.H., Schenk M.A.M., Madruga C.R., Sacco A.M.S. & Miguita M. 1992. Tristeza parasitária dos bovinos (TPB), p. 1-30. In: Charles T.P. & Furlong J. (ed.) Doenças Parasitárias dos Bovinos de Leite. Embrapa-CNPGL, Coronel Pacheco, MG.
- Madruga C.R., Kessler R.H., Gomes A., Schenk M.A.M. & Andrade D.F. 1985. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzootica, nos bezerros da raça nelore, ibagé e cruzamento de nelore. Pesq. Agropec. Bras. 20(1): 135-142.
- Madruga C.R., Marques A.P.C., Miguita M., Schenk M.A.M. & Kessler R.H. 1996. A preliminary evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies, against *Anaplasma marginale*. Annals XV Panamerican Congress of Veterinary Sciences, Campo Grande, MS, Brazil, p.297. (Summary)
- Oliveira A.A., Pedreira P.A.S. & Almeida M.F.R.S. 1992. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasmosse no estado de Sergipe. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 44(5): 377-386.
- Payne R.C. & Scott S.M. 1982. Anaplasmosis and babesiosis in Sahadan. Trop. Anim. Hlth Prod. 14: 75-80.
- Ribeiro M.F.B. & Reis R. 1981a. Prevalência da anaplasmosse em quatro regiões do estado de Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. UFMG. 33(1): 57-62.
- Ribeiro M.F.B. & Reis R. 1981b. Exposição natural de bezerros, em áreas endêmicas de *Anaplasma marginale*, de Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. UFMG. 33(1): 63-66.
- Ribeiro M.F.B., Patarroyo J.H., Santos J.L. & Farias J.E. 1984. Epidemiologia da anaplasmosse bovina no estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 36(4): 425-432.
- Ribeiro M.F.B. 1991. Morfologia, evolução e reprodução do *Anaplasma marginale* Theiler, 1910 em células epiteliais intestinais de teleóginas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Estudo ao microscópio óptico e eletrônico. Tese de doutorado, UFMG, Belo Horizonte. 134p.
- Rogers R.J., Blight G.W. & Knott S.S. 1978. A study of the epidemiology of *Anaplasma marginale* infections of cattle of complement-fixing antibodies. Aust. Vet. J. 54(3): 115-120.
- Souza J.C.P., Soares C.O., Scofield A., Madruga C.R., Cunha N.C., Massard C.L. & Fonseca A.H. 2000. Soroprevalência de *Babesia bigemina* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. Pesq. Vet. Bras. 20(1): 26-30.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J. 1962. A importância da anaplasmosse em nossos bezerros e as medidas de seu controle. Veterinária, Rio de J., 15(3-4): 11-19.
- Vidotto O., Yamamura M.M., Andrade G.M., Barbosa C.S., Freire R.L. & Vidotto M.C. 1995. Ocorrência de *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos de bovinos leiteiros da região de Londrina, PR. Revta Bras. Parasitol. Vet. 4(2, Supl.1): 184.
- Vidotto O., Vidotto M.C., Andrade G.M., Palmer G., McElwain T. & Knowles D.P. 1997. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* on cattle in Paraná state, Brazil, by major surface protein 5 competitive enzyme-linked immunosorbent assay. Revta Bras. Parasitol. Vet. 6(2, Supl.1): 321.