

Filipe Lucas de Melo Mendonça

**UTILIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Anaplasma marginale* DE BAIXA
VIRULÊNCIA EM PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO DE BEZERROS:
ANÁLISE DOS EFEITOS PÓS-VACINAIS E PROTEÇÃO CONTRA O
DESAFIO NATURAL**

Dissertação apresentada ao colegiado de Pós-Graduação em Ciência animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Elias Jorge Facury Filho

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2015

M539u Mendonça, Filipe Lucas de Melo, 1988-
Utilização de isolados de *Anaplasma marginale* de baixa virulência em protocolos de imunização de bezerros: análise dos efeitos pós-vacinais e proteção contra o desafio natural / Filipe Lucas de Melo Mendonça. – 2015.
69 p. : il.

Orientador: Elias Jorge Facury Filho
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Bezerro – Doenças – Teses. 2. Anaplasmoses – Teses. 3. Anaplasmoses – Aspectos imunológicos – Teses. 4. Virulência (Microbiologia) – Teses. 5. Vacina veterinária – Teses. I. Facury Filho, Elias Jorge. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.208 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

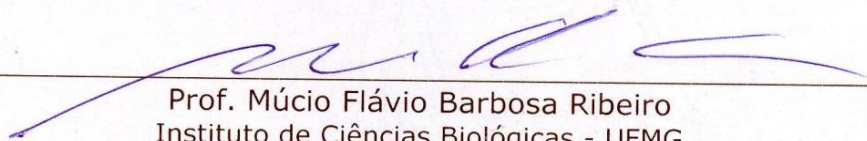
FILIPE LUCAS DE MELO MENDONÇA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS.

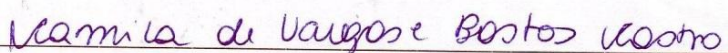
Aprovada em 10 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:



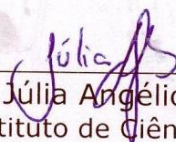
Prof. Elias Jorge Facury Filho
Presidente - Orientador



Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG



Profª. Camila de Valgas Bastos
FEAD



Profª. Júlia Angélica Gonçalves da Silveira
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

*Dedico este trabalho
Aos meus pais e irmãos...
Sem eles nada seria possível.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar com sua força divina, proporcionando inúmeras coisas boas nesse período e permitir que eu conduzisse esse trabalho até o fim.

Aos meus pais Jairo e Maria Helena que mesmo sem saber ao certo o que eu faço me apoiam incondicionalmente em todos os momentos e decisões que eu tomo. Sem vocês nada seria possível.

Aos meus irmãos Patrícia, Mateus e Maria Carolina pelo apoio e força.

Aos meus avós, todos os tios e primos que me incentivaram a continuar nesse caminho, em especial aos tios Chico e Eliane pela presença e demonstrarem interesse nas minhas atividades.

Ao meu padrinho e tio, João Bosco Magela Mendonça (*in memoriam*) por mostrar que este seria melhor caminho a seguir e que eu era capaz de sobressair à realidade imposta às gerações anteriores da família.

Ao professor Elias Jorge Facury, pela amizade, orientação, paciência e confiança depositada ao acreditar na minha capacidade. Pelo exemplo profissional e pessoal que representa para mim.

Ao professor Antônio Último de Carvalho, pelas conversas e pelo carinho com que ensina, acolhe e se dedica aos alunos. Obrigado por me mostrar que eu posso ser cada dia melhor.

Ao professor Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, pela oportunidade de trabalho e aprendizado. Pelos conhecimentos transmitidos e pelo exemplo ético e profissional.

Ao José Azael Zambrano Uribe, por ter abraçado o projeto ao meu lado na fase de coleta. Obrigado pela amizade construída, pela companhia, conversas, risadas e muito aprendizado trabalhando juntos.

À Júlia Gomes, Gustavo Moreira, João Paulo Andrade e Philipe Pimenta pelo apoio e por tentar me acalmar e mostrar as soluções nos momentos em que chegava desespero.

A Júlia Silveira pelos ensinamentos e colaboração nas análises deste trabalho, ajudando apesar de suas inúmeras outras tarefas.

A Bruna Silvestre pelo apoio, dedicação e paciência ao ensinar e ajudar em tudo, apesar de todos os seus afazeres. Obrigado pela disponibilidade e disposição em ajudar e orientar nas análises moleculares e interpretação dos dados, de um jeito que só amigos fazem um pelo outro. Foi um prazer trabalhar com você.

Aos médicos veterinários da Fazenda São João, Paulo Henrique Garcia e Victor de Paula, pela parceria ao disponibilizar a fazenda e os animais para o trabalho, assim como aos demais funcionários, (Alberto, Lucas, Renato, Pedrinho, Sandra, Maurílio, Jorge, Flávio, Pedro Velho, Elizangela, Julimar, Isabel e muitos outros) pelas muitas horas de convívio e disposição em auxiliar nas coletas ou com uma boa conversa.

A todos do Laboratório de Parasitologia Molecular, em especial à Professora Élide por colaborar com o trabalho abrindo as portas do laboratório; à Nayara, Fernando e Pedro pelo suporte no laboratório quando precisei.

A todos os alunos da graduação, estagiários curriculares, residentes e amigos (Rafael Perez, Nina, Rafael Santana, Thiago Simões, Raquelzinha, Roberta, Carol Werkema, Samuel, José Eustáquio, Clóvis, Natan, Bárbara, Danillo, Thiago Marins e Hector que deram uma força na fazenda contribuindo fortemente para as coletas de material.

Ao Diogo, Danila e Markus, obrigado pela oportunidade e o prazer de trabalhar com os melhores alunos de iniciação científica que conheci. Sempre dispostos a aprender e ajudar com muito entusiasmo em todas as ocasiões. Se eu fui capaz de ensinar alguma coisa, saibam que com vocês eu aprendi muito mais.

Ao professor Ivan Barbosa Machado Sampaio pela consultoria estatística e as amigas Patrícia Auler, Juliana Bicalho e Bruna Silvestre, pela ajuda na realização das análises.

A Layanne, pela ajuda com o trabalho e pelo apoio carinhoso de amiga nos momentos do experimento em que mais precisei.

Ao Matheus Serafini, por ter sido um grande amigo prestando-me ajuda no serviço e dando-me força com sua palavra. Com isso doou-me boa parte do seu tempo livre, um dos maiores presentes que alguém pode receber.

Ao Frederico Alves dos Reis, pela sinceridade de amigo, sem nunca medir esforços para me tirar da normose acadêmica com uma conversa engraçada, estimulante e sempre que preciso aconselhadora.

Aos alunos amigos da graduação, Maria Clara, Markus, Diogo, Kai, Fred, Débora, Pedro, Samila, Thaís, Belle, Lívia, Ana Luíza e Rodrigo, por me fazerem rir inúmeras vezes e me tirar das neuras da pós-graduação.

Aos velhos amigos, de Pará de Minas (Antonízia e Felipe) e da graduação (Carlos, Isabela Carla, Hariany, Isabela Lanza, Juliana, Vanessa, Joana, Marília e Amanda) pela compreensão da minha ausência em diversos momentos.

As amigas, agregadas e aos professores do setor de Toxicologia, Professor Benito, Professora Marília, Lílian, Heloisa, Marina, Luisa, Tati e Raquel, pelo apoio, companhia e horas de lazer.

Ao Colegiado Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela oportunidade.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Por fim, aos bezerros, que involuntariamente contribuíram para realização desse trabalho de pesquisa e acima de tudo para meu aprendizado. Espero que os frutos desse trabalho sirvam em benefício de muitos outros animais.

*“Combati o bom combate, completei a corrida e
perseverei na fé. Agora me está reservada a coroa da
justiça...”*

2 Tm 4: 7-8

*“A grande arte é mudar durante a batalha. Ai do
general que vai para o combate com um esquema”.*

Napoleão Bonaparte

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Geral	18
2.2. Específicos	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1. <i>Anaplasma marginale</i>	19
3.2. Distribuição, epidemiologia e fatores de risco.....	20
3.3. Transmissão	21
3.4. Ciclo biológico.....	23
3.5. Patogenia e manifestações clínicas	24
3.6. Resposta imunológica contra <i>Anaplasma marginale</i>	25
3.7. Medidas de controle.....	25
3.7.1. Vacinas mortas ou inativadas de <i>Anaplasma marginale</i>	26
3.7.2. Vacinas Vivas.....	27
3.7.2.1. Vacina viva de <i>Anaplasma centrale</i>	27
3.7.2.2. Vacina viva de <i>Anaplasma marginale</i> atenuado	28
3.7.2.3. Vacinas vivas de <i>Anaplasma marginale</i>	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
PARTE I – EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	31
4.1. Local e período do experimento	31
4.2. Inóculos de <i>Anaplasma marginale</i>	31
4.3. Aprovação pelo comitê de ética	31
4.4. Animais experimentais	312
4.5. Delineamento experimental	34
4.6. Coletas de sangue.....	35
4.7. Monitoramento dos animais	36
4.7.1. Efeitos pós-vacinais (virulência dos inóculos).....	36
4.7.2. Resistência ao desafio natural	36
PARTE II - ANÁLISES LABORATORIAIS	37
4.8. Locais	37
4.9. Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI).....	37
4.10. Análise Molecular	37
4.10.1. Extração de DNA.....	38
4.10.2. Amplificação do DNA	38

4.10.3. Eletroforese em gel de agarose	39
4.11. Análises estatísticas	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Efeitos pós-vacinais	40
5.1.1 Riquetsemia.....	40
5.1.2 Temperatura Retal.....	46
5.1.3 Volume Globular	407
5.2. Resistência à virulência dos inóculos	50
5.3. Frequência de infecção verificada na <i>nested</i> PCR.....	53
5.4. Detecção de anticorpos através da RIFI.....	535
5.5. Resistência ao desafio natural	536
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
7. CONCLUSÕES.....	59
8. REFERÊNCIAS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico de <i>A. marginale</i> no hospedeiro bovino e em carrapatos.	23
Figura 2: Instalações utilizadas para a realização de cuidados iniciais com os recém-nascidos utilizados nesse estudo na fazenda localizada no município de Inhaúma-MG no ano de 2013.....	32
Figura 3: Instalações utilizadas para bezerras deste trabalho até atingirem 30 dias de vida (A); Bezerreiro em sistema de casinha onde os animais em experimentação permaneceram dos 30 aos 90 dias de idade, quando foram desaleitados (B).....	32
Figura 4: Piquetes utilizados para recria dos animais utilizados no experimento após o desmame (90 dias). Os animais foram mantidos rotacionando em piquetes com ambiente semelhante durante toda a fase de desafio natural (durante quatro meses após o desaleitamento).....	33
Figura 5: Organograma de inoculações realizadas neste experimento utilizando as amostras <i>A. marginale</i> (UFMG 1 e UFMG 3) em bezerras da raça holandesa com idade inicial entre um e 43 dias.	35

Figura 6: Fluxograma de coletas de sangue de bezerras da raça holandesa com idade inicial entre um e 43 dias, inoculados com amostras de <i>A. marginale</i> (UFMG1 e UFMG3).	35
Figura 7: Dinâmica das riquetsemias durante o tempo de avaliação dos efeitos pós-vacinais (0 a 80 dias do experimento). Os valores representam as médias de riquetsemia em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de <i>A. marginale</i> (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental. Médias com letras diferentes representam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os grupos.	43
Figura 8: Dinâmica das riquetsemias durante o tempo de avaliação dos efeitos pós-vacinais (0 a 80 dias do experimento). Os valores representam as médias de riquetsemia em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de <i>A. marginale</i> (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental. Médias com letras diferentes representam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os grupos. Nessa análise foi considerado apenas os animais <i>n</i> PCR negativos antes da primeira inoculação.....	44
Figura 9: Avaliação dos efeitos pós-vacinais (riquetsemia média de <i>A. marginale</i>) em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: UFMG 3 + UFMG 3; G2: UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental. As setas indicam o momento das inoculações e os asteriscos indicam os dias em que houveram aumentos de riquetsemia ($p < 0,05$).....	44
Figura 10: Avaliação dos efeitos pós-vacinais (riquetsemia média de <i>A. marginale</i>) em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: UFMG 3 + UFMG 3; G2: UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental. Os asteriscos indicam os dias em que houveram aumentos de riquetsemia ($p < 0,05$). Nessa análise foram considerados apenas animais <i>n</i> PCR negativos na primeira inoculação.	45
Figura 11: Dinâmica da temperatura retal durante o tempo de avaliação dos efeitos pós-vacinais (0 a 80 dias do experimento). Os valores representam as médias de temperatura retal em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de <i>A.</i>	

<i>marginale</i> (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental.....	46
Figura 12 Dinâmica da temperatura retal durante o tempo de avaliação dos efeitos pós-vacinais (0 a 80 dias do experimento). Os valores representam as médias de temperatura retal em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de <i>A. marginale</i> (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental.....	47
Figura 13: Dinâmica do volume globular durante o tempo de avaliação dos efeitos pós-vacinais (0 a 80 dias do experimento). Os valores representam as médias de volume globular em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de <i>A. marginale</i> (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental. Médias com letras diferentes representam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os grupos.	48
Figura 14: Associação entre as médias de volume globular (VG) e as médias de riquetsemia (Riq) observados em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de <i>A. marginale</i> (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental.	49
Figura 15: Dinâmica do volume globular durante o tempo de avaliação dos efeitos pós-vacinais (0 a 80 dias do experimento). Os valores representam as médias de volume globular em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de <i>A. marginale</i> (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental. Médias com letras diferentes representam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os grupos. Nessa análise foram considerados apenas os animais <i>n</i> PCR negativos antes da primeira inoculação.	50
Figura 16: Frequência de tratamento antimicrobiano (enrofloxacina - 7,5 mg kg ⁻¹) durante as inoculações (A) e na fase de desafio dos inóculos (B) em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de <i>A. marginale</i> (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental.	52

Figura 17: Frequência (%) de bezerras experimentalmente inoculadas na idade entre um e 43 dias de vida com duas amostras de <i>A. marginale</i> (UFMG 1 e UFMG 3) positivos na RIFI (título de 1:40) na análise pré-inoculação, 40 dias após a primeira inoculação, 40 dias após a segunda inoculação e após o desafio natural.....	55
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Instalações, manejo e presença de vetores aos quais os animais do experimento foram submetidos durante a execução deste trabalho.....	34
Tabela 2: Protocolos utilizados no presente estudo para as inoculações dos isolados de baixa virulência de <i>A. marginale</i> (UFMG1 e UFMG3) utilizados nas bezerras da raça holandesa com idade inicial entre um e 43 dias.....	34
Tabela 3: Sequência de iniciadores e produtos de cada reação para diagnóstico de <i>A. marginale</i>	38
Tabela 4: Programa utilizado para realização de <i>n</i> PCR para identificação de <i>A. marginale</i>	38
Tabela 5: Condição para reação de <i>n</i> PCR para <i>A. marginale</i>	39
Tabela 6: Comportamento da riquetsemia em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de <i>A. marginale</i> (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G3: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental. Dados referentes a análise de todos os animais (Positivos e negativos na <i>n</i> PCR e apenas dos negativos na <i>n</i> PCR).....	40
Tabela 7: Frequência (%) de hipertermia durante o tempo de avaliação dos efeitos pós-vacinais (0 a 80 dias do experimento) em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de <i>A. marginale</i> (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G3: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental.	47
Tabela 8: Frequência de tratamentos realizados nas bezerras dos grupos experimentalmente inoculados com duas amostras de <i>A. marginale</i> (UFMG 1 e UFMG 3), momentos em que foram realizados os tratamentos com enrofloxacina a 7,5 mg/kg após a primeira inoculação	

(*Média e variação). Protocolos utilizados: Grupo 1(G1): UFMG 1 + UFMG 1, Grupo 2(G2): UFMG 3 + UFMG 3, Grupo 3(G2): UFMG 1 + UFMG 3, Grupo 4 (G4): controle experimental..... 52

Tabela 9: Frequência (%) de bezerras experimentalmente inoculadas na idade entre um e 43 dias de vida com duas amostras de *A. marginale* (UFMG 1 e UFMG 3) que se tornaram positivos na *n*PCR (*msp4*) após cada inoculação e do desafio natural, partindo apenas dos animais com resultado negativo na análise pré-inoculação (dia 0). 53

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
°C	Grau centígrado
cELISA	Ensaio imunossorvente ligado a enzimas competitivo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CV	Coefficiente de variação
DCCV	Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado a enzimas
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
h	horas
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IDE8	Linhagem de células embrionárias de <i>Ixodes scapularis</i>
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina da classe G
IL2/IL12	Interleucina do tipo 2/ tipo 12
Kg	Kilograma
mg	Miligrama
MSP	Major Surface Protein (Proteína principal de superfície)
<i>n</i> PCR	Reação em cadeia da polimerase tipo nested
PBS	Solução de tampão fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
Riq.	Riquetsemia
TR	Temperatura retal
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VG	Volume globular, hematócrito

RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo avaliar os efeitos pós-vacinais e a proteção conferida pela inoculação de amostras vivas de *A. marginale* de baixa virulência (UFMG1 e UFMG3) em bovinos desafiados à campo. 68 bezerras da raça holandesa com 17 dias de idade em média foram divididas aleatoriamente em quatro grupos. Os grupos receberam duas aplicações subcutâneas intervaladas de 40 dias, na dosagem de 2×10^6 eritrócitos infectados dos seguintes protocolos: grupo 1 (UFMG 1 + UFMG 1); grupo 2 (UFMG 3 + UFMG 3); grupo 3 (UFMG 1 + UFMG 3); O grupo 4 (controle experimental). A cada dois dias os animais foram avaliados por termometria retal, hematócrito e esfregaço sanguíneo. Antes das inoculações e do desafio e ao final do monitoramento foram colhidas amostras sanguíneas utilizadas na técnica de *nPCR* e RIFI. Em média a temperatura retal e o volume globular se mantiveram nos limites de referência, sem alterações consideráveis causadas pelos inóculos. Após 40 dias da segunda inoculação 90%, 84,62% e 90,9% dos animais dos grupos 1, 2 e 3 respectivamente estavam positivos na *nPCR*. A riquetsemia foi de baixa intensidade nos dias avaliados, mas em todos os grupos alguns animais necessitaram de medicação para controlar os efeitos pós-vacinais. Durante o desafio houve proteção de 86,7% e 73,7% dos animais nos grupos 1 e 2 respectivamente, enquanto que, 58,8% dos animais controle adoeceram.

Palavras-chave: Anaplasrose; *Anaplasma marginale*; vacina viva; virulência; bezerras, desafio natural.

ABSTRACT

In order to evaluate the post-vaccination effects and the protection afforded by the inoculation of live samples of low virulence *A. marginale* (UFMG1 and UFMG3) in cattle challenged in the field. 68 calves Holstein with 17 days old on average were randomly divided into four groups. The groups received two subcutaneous applications with intervals of 40 days, having a dose of 2×10^6 infected erythrocytes of the following protocols: group 1 (UFMG 1 + UFMG 1); group 2 (UFMG 3 + UFMG 3); group 3 (UFMG 1 + UFMG 3); group 4 (experimental control). Every two days, the animals were evaluated by rectal thermometry, hematocrit and blood film. Before inoculations and challenge and at the end of the challenge, blood samples were collected and used to perform IFA technique and *n*PCR. On average, the rectal temperature and the packed cell volume remained within the limits of reference and without considerable changes. 40 days after the second inoculation 90%, 84.62% and 90.9% of the animals in groups 1, 2 and 3 respectively were positive in *n*PCR. The rickettsemia was of low intensity but some animals of all groups required medication to control post-vaccination effects. During the challenge 86.7% and 73.7% of the animals was protected in groups 1 and 2 respectively, whereas 58.8% of the control animals became sick.

Keywords: Anaplasmosis; *Anaplasma marginale*; live vaccine; virulence; calves, natural challenge.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A anaplasmosse bovina é uma doença infecciosa causada pela riquetsia intra-eritrócitaria *Anaplasma marginale*. A anaplasmosse é amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais do mundo e é considerada como uma das principais enfermidades de bovinos, gerando grandes prejuízos para produção animal (Kocan et al., 2010). No Brasil, a doença é descrita como causa de alta mortalidade em bezerros (Ribeiro et al., 1983) e os prejuízos gerados por *Anaplasma marginale* juntamente ao complexo de patógenos responsável pelo quadro clínico da tristeza parasitária bovina são estimados em 500 milhões de dólares por ano (Grisi et al., 2002). Nos EUA as perdas econômicas mais significativas causadas pela anaplasmosse em todo rebanho são representadas por atraso no crescimento, mortalidade, aborto e queda na produção de leite e carne (Kocan et al., 2003).

A disseminação de *A. marginale* nos rebanhos pode ocorrer através de transmissão iatrogênica, vertical ou por vetores, biológicos ou mecânicos (Kocan et al., 2003), que na América do Sul são representados pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e moscas hematófagas (Guglielmone, 1995).

A manifestação clínica da doença varia entre raças, manejo e principalmente em função da idade do animal acometido. Os bovinos adultos, maiores que três anos de idade e sem contato prévio com o agente infeccioso, são os indivíduos mais suscetíveis à manifestação grave e fatal da doença, enquanto bezerros menores de um ano de idade geralmente tendem a manifestar a doença de forma mais moderada (Ristic, 1968). Dessa forma, em regiões endêmicas sob condições naturais, o ideal seria que a infecção ocorresse nos primeiros dias de vida do animal, quando há resistência natural à doença, devido à presença de anticorpos colostrais, maior eritropoiese da medula óssea, rápida resposta da imunidade celular e à presença de hemoglobina fetal nos eritrócitos (revisado por Ribeiro e Passos, 2002).

Entretanto, nem sempre os animais se infectam em uma idade precoce, devido a vários fatores, dentre eles, o fator climático que interfere no ciclo biológico dos vetores, o controle excessivo de ectoparasitos ou mesmo pelo sistema de criação ou produção no qual os animais são submetidos (Melo et al., 2001; Marana et al., 2009). A doença pode se caracterizar em duas situações distintas epidemiologicamente denominadas como estabilidade e instabilidade enzoótica, que ocorrem em função do momento da vida no qual os animais se primoinfectam (Jonsson et al., 2012).

Nas áreas de estabilidade enzoótica os animais tem contato precoce com vetores no campo e pelo menos 75% dos animais se infectam com *A. marginale* no início da vida e se tornam portadores, mas há poucos casos clínicos no rebanho. Enquanto nas áreas de instabilidade, a maior parte dos animais se infecta tardiamente e quadros clínicos da doença são frequentes (Wanduralla e Ristic, 1993).

São necessárias medidas de controle e prevenção da doença clínica para garantir a redução das perdas econômicas associadas. Em regiões endêmicas, essas medidas não visam impedir a infecção, mas atingir um equilíbrio entre o desafio infeccioso e a resistência do animal. A meta é conseguir que a maior parte dos animais sejam primoinfectados nos primeiros meses de vida (Ribeiro et al., 2003).

Atualmente as estratégias de controle em áreas endêmicas se baseiam no uso da quimioprofilaxia, na redução do número de vetores e na vacinação. O uso destes métodos se limita pela disponibilidade, custo e aplicabilidade a cada contexto epidemiológico. Entre os métodos de controle, a vacinação é considerada uma medida efetiva e de baixo custo a ser aplicadas em situações de instabilidade enzoótica (Kocan et al., 2003).

Amostras vivas de *A. centrale* têm sido utilizadas em vários países como vacina (Kocan et al., 2003), pelo fato desses isolados compartilharem antígenos determinantes de imunidade com *A. marginale* (Shkap et al., 1991). Entretanto, a proteção conferida pela vacina de *A. centrale* apresenta respostas variáveis e muitas vezes insatisfatórias (Wilson et al., 1980; Brizuela et al., 1998; Guglielmo et al., 1999). Em contrapartida, o uso de inóculos padronizados de isolados de *A. marginale* de baixa virulência tem se mostrado uma alternativa promissora para aplicação a campo (Ribeiro et al., 1997; Bastos et al., 2010; Meneses, 2013).

Os isolados de *A. marginale* UFMG 1 e UFMG 3 que foram considerados de baixa virulência quando aplicados na dose infectante de 2×10^7 eritrócitos infectados, levaram bezerros a níveis de riquetsemia e queda do volume globular relativamente altas (Bastos et al., 2010; Meneses, 2013). Como estes parâmetros são influenciados por vários fatores, acredita-se que a administração por via subcutânea e a utilização de uma dose do inóculo menor que a empregada nos estudos anteriores, poderia tornar o processo de imunização mais seguro para a saúde dos animais, amenizando a elevação da riquetsemia e a redução do hematócrito, além de acelerar a recuperação dos animais (Meneses, 2013).

No campo, os animais são suscetíveis a muitas possibilidades de desafios devido a comprovada existência de grande diversidade genética de *A. marginale*, mesmo dentro de um único rebanho infectado naturalmente (Pohl et al., 2013). Assim, entre as principais vantagens das vacinas vivas contra desafios heterólogos incluem-se um conjunto completo de antígenos de superfície na sua conformação original e presença de novas proteínas de superfície no decorrer da infecção (Hammac et al., 2013).

Embora o impacto causado pela doença seja representativo, atualmente ainda não está disponível uma vacina com completa segurança e de alta eficácia contra a anaplasmoze. Uma boa maneira de avaliar a eficácia conferida pelas vacinas é exposição de animais vacinados à infecção natural em área endêmica. Considerando que o uso como imunógeno de amostras vivas de *A. marginale* de baixa virulência é uma estratégia promissora na prevenção e controle da doença, a avaliação dos efeitos causados pela inoculação dessas amostras em bezerros criados em situação de instabilidade enzootica e posteriormente desafiados naturalmente por vetores no campo pode testar sua capacidade protetora em condições epidemiológicas de indicação da vacina.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- ✓ Avaliar os efeitos pós-vacinais da aplicação de duas amostras vivas de *A. marginale* de baixa virulência (UFMG1 e UFMG3) e a proteção conferida pela inoculação de bezerros contra o desafio natural no campo.

2.2. Específicos

- ✓ Avaliar a percentagem de animais infectados após as inoculações das amostras de *A. marginale*;
- ✓ Avaliar a temperatura retal, o volume globular e a riquetsemia de bezerros inoculados com as amostras de *A. marginale* UFMG 1 e UFMG 3 em diferentes protocolos de duas doses de 2×10^6 eritrócitos infectados;
- ✓ Verificar a frequência de animais que necessitaram ser tratados devido aos efeitos das inoculações de *A. marginale* UFMG 1 e 3 nos diferentes protocolos;
- ✓ Verificar quais protocolos de inoculação de *A. marginale* UFMG 1 e 3 conferem melhor proteção aos animais vacinados quando expostos a infecção natural por vetores.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Anaplasma marginale*

A anaplasmosse bovina é uma doença infecciosa causada por *Anaplasma marginale*, uma riquetsia intra-eritrocitária, classificada na ordem Rickettsiales e na família Anaplasmataceae, (Dumler et al., 2001).

Em 1893 essa riquetsia já havia sido observada em esfregaços de sangue de bovinos doentes corados pelos pesquisadores Smith e Kilbourne durante seus estudos com *Babesia bigemina*, no qual notaram a ocorrência de corpúsculos semelhantes a coccus que se localizavam na margem dos eritrócitos de bovinos infectados. Na ocasião, sem saber que se tratava de uma infecção mista, consideraram que essas estruturas eram algum estágio do ciclo de *B. bigemina* (revisado por Wanduragala e Ristic, 1993). Acreditou-se nisso até que Theiler (1910) conseguiu comprovar a infecção mista isolando os agentes em infecções puras de *B. bigemina* e o novo organismo que foi identificado como *A. marginale* (revisado Kocan et al., 2010). Posteriormente foi identificada para o mesmo gênero deste microrganismo, uma espécie menos virulenta que foi denominada como *A. centrale* (Theiler, 1911). O nome do gênero *Anaplasma*, se deve à ausência de citoplasma do microrganismo e as espécies “marginale” e “centrale” referem-se respectivamente à localização periférica e central, ocupada pelos corpúsculos de inclusão dentro dos eritrócitos infectados (revisado por Wanduragala e Ristic, 1993).

Os membros da família Anaplasmataceae apresentam parede celular similares as de bactérias Gram negativas, porém não tem a camada de peptidoglicano (Quinn et al., 2011). A espécie *A. marginale* é obrigatoriamente uma bactérias intracelular de eritrócitos desenvolvendo-se dentro de vacúolos parasitóforos de localização periférica. Morfologicamente, são vistos em microscopia óptica em eritrócitos infectados corados por Romanosvsky como corpúsculos de inclusão densos, homogêneos, roxo-azulados, com formato redondo à ovalado medindo de 0,3 a 1,0 µm de diâmetro. A observação desses corpos marginais por microscopia eletrônica demonstra que são compostos por 4 a 8 subunidades conhecidas como corpúsculos iniciais que medem de 0,3 µm a 0,4 µm de diâmetro e compreendem os elementos infectantes (Wanduragala e Ristic, 1993).

Com o uso de técnicas da microscopia de contraste de fases, coloração pelo novo azul de metileno, reação de imunofluorescência indireta e microscopia eletrônica foi possível identificar duas formas morfológicas distintas de *A. marginale*, com ou sem presença de apêndice de inclusão (Kreier e Ristic, 1963; Kocan et al. 1984). Estirpes com essas duas características morfológica foram isoladas em diferentes estados dos Estados Unidos (Kreier e Ristic, 1963) e se mostraram sorologicamente e antígenicamente distintas (Kuttler e Winnard, 1984). No Brasil, no estado de Minas Gerais, Ribeiro et al. (1997) isolaram a única amostra de *A. marginale* com apêndice registrada no país até o momento, a partir do sangue de um bezerro naturalmente infectado que manifestava sinais clínicos de anaplasmosse aguda. Esta amostra de *A. marginle* com apêndice foi posteriormente nomeada UFMG 1 (Bastos et al., 2010).

3.2. Distribuição, epidemiologia e fatores de risco

A doença é amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo considerada endêmica em regiões do continente africano, asiático e europeu, onde ocorre principalmente nos países do mediterrâneo. No continente americano, a anaplasmoze é relatada em quase todos os estados dos EUA, e é considerada enzoótica em todos os estados do sul do Atlântico, do Golfo, estados da costa, e vários dos estados do Centro-Oeste e ocidentais. O México, as Ilhas do Caribe, a América Central e do Sul são também áreas endêmicas (Kocan et al., 2010). Guglielmone (1995) descreve a distribuição geográfica da doença como enzoótica em quase todos os países da América Latina, com exceção das áreas de deserto e de grandes altitudes, o que coincide com a distribuição do vetor biológico, o carrapato *R. microplus*.

Do ponto de vista epidemiológico, cada região pode ser classificada como área de estabilidade ou instabilidade enzoótica. As situações de estabilidade enzoótica são identificadas quando a taxa de infecção por vetores no ambiente é suficiente para infectar a maioria dos bezerros antes que a resistência inata contra a doença clínica se perca, o que acontece entre seis e nove meses de idade. Dessa forma, pelo menos 75% dos bovinos são infectados e imunizados antes de atingir uma idade suscetível. Nesses casos, apesar da infecção, geralmente se observa ausência de doença clínica em bezerros e um alto nível de imunidade em bovinos adultos associado consequentemente a baixa incidência da doença. Por outro lado, em áreas de instabilidade enzoótica a maior parte dos animais se infectam tardiamente, sendo frequente a observação de quadros clínicos da doença (Mahoney e Ross, 1972; Madruga et al., 1985).

A realização de estudos sorológicos dos animais de uma determinada região torna possível estabelecer o risco de doença através da caracterização epidemiológica dos rebanhos analisados (Souza et al., 2000; Souza et al., 2013). No Brasil, estudos com esse objetivo descrevem várias localidades do país com elevada prevalência, o que caracteriza as áreas de estabilidade enzoótica (Ribeiro e Reis, 1981; Souza et al., 2000; Souza et al., 2001; Andrade et al., 2001; Barros et al., 2005; Trindade et al., 2011; Souza et al., 2013).

Inquéritos sorológicos utilizando o testes de ensaio imunoabsorventes ligados a enzima (ELISA) para *A. marginale* em bovinos do estado do Rio de Janeiro mostraram uma prevalência de 91,16% na mesoregião Norte Fluminense (Souza et al., 2000) e 98,8% na mesoregião do Médio Paraíba (Souza et al., 2001). Em quatro regiões do estado de Minas Gerais (Alto Paranaíba, Zona Metalúrgica, Sul de Minas e Triângulo Mineiro) a doença foi caracterizada como epizootica devido aos frequentes surtos, com a prevalência variando de 86,1 a 93,1% no teste do cartão (Ribeiro e Reis, 1981). Na bacia leiteira do Parnaíba no estado do Piauí, a taxa de soroprevalência através da RIFI foi de 89,1% (Souza et al., 2013); através do teste de ELISA indireto, no semi árido baiano foi de 97% a 98,9% (Barros et al., 2005) e na região de Araguaína no Tocantins de 89,9% (Trindade et al., 2011). Resultados semelhantes foram observados na região norte do estado do Paraná, onde 92,94% dos animais foram soropositivos no teste ELISA competitivo (cELISA) (Andrade et al., 2001). Porém, na região noroeste do mesmo estado foi registrada uma prevalência de 76,10% no teste cELISA sugerindo que os animais estão parcialmente protegidos contra a infecção por *A. marginale* nesses locais, podendo haver surtos da doença (Yoshihara et al., 2003).

A identificação de baixa prevalência em regiões pesquisadas caracteriza a condição de instabilidade enzoótica, na qual há maior risco de mortalidade em animais adultos (Mahoney e Ross, 1972). Tais situações foram encontradas nas regiões climáticas árida, semi-árida, de transição semi-árida e transição subúmida do estado de Sergipe, com prevalência no teste do cartão de 16,3% (Oliveira et al., 1992). Provavelmente, nessas regiões, a baixa prevalência é causada pelas condições adversas de temperatura e umidade, que podem interferir no desenvolvimento do vetor *R. (Boophilus) microplus*, como na região Centro-Sul do estado do Paraná que também recebeu a mesma caracterização epidemiológica, onde apenas 58,74% das amostras foram positivas pelo teste cELISA-PR1 (Marana et al., 2009).

Entretanto, não apenas os fatores ambientais são importantes para a epidemiologia da anaplasmose. É necessário considerar associadamente os fatores intrínsecos de cada sistema, como o tipo de pastagem, a densidade animal e dos vetores, e as medidas de controle adotadas para então classificar a relação de risco de ocorrência da doença em áreas endêmicas (Silva e Fonseca, 2013). Melo et al. (2001) verificaram que a ocorrência da primo-infecção sofre influência das estações do ano e do sistema de criação adotado para os bezerros. Dessa forma, bezerros que nascem na estação seca ou são mantidos em sistemas que limitem o contato com vetores apresentam maior risco de doença quando expostos as condições de elevada transmissão durante a estação chuvosa ou a outro sistema de manejo. Assim, no estudo da anaplasmose cada fazenda representa uma unidade epidemiológica na qual o ambiente e os fatores imunológicos interagem e podem influenciar o estado endêmico do patógeno (Silva e Fonseca, 2014).

3.3. Transmissão

Anaplasma marginale pode ser transmitido aos bovinos susceptíveis de forma biológica, mecânica ou vertical. A transmissão biológica é feita por carrapatos após a ingestão de eritrócitos infectados pela riquetsia, na qual apresenta a capacidade de se replicar nas células intestinais deste artrópode e, posteriormente, serem eliminadas na saliva deste durante o repasto sanguíneo. Aproximadamente 20 espécies de Ixodídeos têm sido incriminadas como vetores biológicos de *A. marginale* em todo o mundo. Em geral, são citados os carrapatos *Rhipicephalus* spp., *Dermacentor* spp. e *Ixodes ricinus*, enquanto que o *Amblyomma* spp. parece não estar envolvido na transmissão (revisado por Kocan et al., 2004). Segundo Guglielmo (1995), carrapatos *R. microplus* são encontrados em quase toda América do sul e Central, portanto é considerada a espécie transmissora biológica da riquetsia no Brasil. Esse fato foi comprovado pela observação do desenvolvimento de colônias de *A. marginale* em células epiteliais do intestino de fêmeas ingurgitadas do carrapato (Ribeiro e Lima, 1996).

Stich et al., (1989) demonstraram que a transmissão pelo carrapato *D. variabilis* pode ocorrer entre estágios de desenvolvimento do artrópode (transestadial) ou no mesmo estágio (intraestadial), enquanto a transmissão de uma geração de carrapatos à outra (transovariana) parece não ocorrer. A tentativa de conseguir a transmissão de *A. marginale* por via transovariana pelo *R. microplus* a um bovino suscetível não teve sucesso e estabeleceu sob as condições experimentais que se trata de um mecanismo que não ocorre com frequência na natureza (Ribeiro et al., 1996).

A transmissão intraestadial de *A. marginale* parece ser epidemiologicamente importante, uma vez que carrapatos machos adultos de *D. andersoni* apresentam altas taxas de infecção em associação a um comportamento alimentar intermitente e a observação de que apenas alguns carrapatos infectados são necessários para a transmissão (Eriks et al., 1993). Na mesma importância desse mecanismo são incluídas as espécies *R. microplus* e *D. albipictus* (Kocan et al., 2003).

Os carrapatos são capazes de se superinfectar com mais de uma estirpe geneticamente distinta de *A. marginale* e transmitir ambas ao hospedeiro bovino. Isso indica que, após a introdução inicial de um novo isolado em um rebanho cronicamente infectado de uma área endêmica para *A. marginale*, tanto a nova, quanto a linhagem existente podem ser co-transmitidas para animais suscetíveis, ampliando, assim, a representação da nova linhagem dentro do rebanho (Leverich et al., 2008).

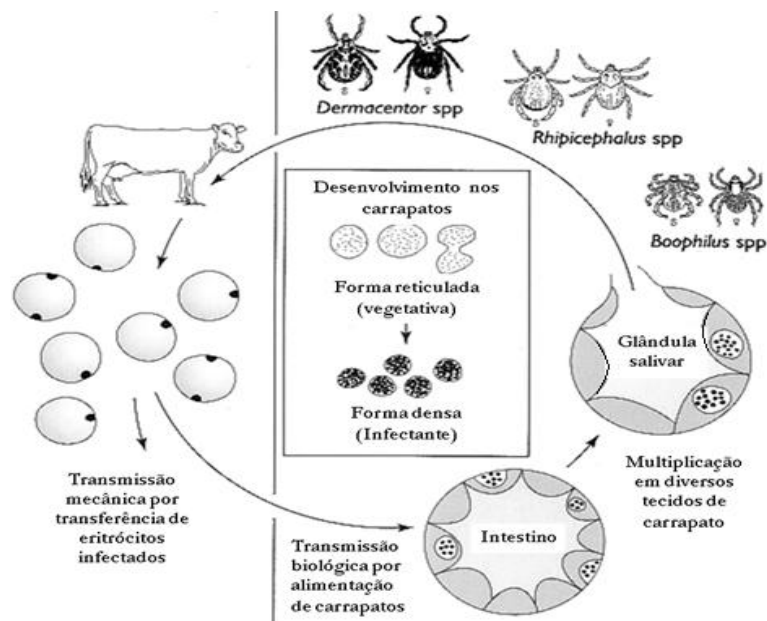
Na transmissão mecânica, eritrócitos infectados são transferidos aos bovinos suscetíveis sem amplificação de *A. marginale*, através de picadas de moscas ou fômites contaminados com sangue, incluindo agulhas ou instrumentos cirúrgicos (Aubry e Geale, 2011).

Insetos hematófagos são citados como vetores mecânicos de *A. marginale*. Nesse grupo incluem-se os dípteros hematófagos do gênero *Tabanus* e *Stomoxys*, e várias espécies de mosquitos (Revisado por Kocan et al., 2010). Essa forma de transmissão é considerada a principal via de disseminação da riquetsia em certas áreas dos EUA, América Central, América do Sul e África, onde os carrapatos vetores estão ausentes (Ewing 1981; Foil 1989) e onde o *R. microplus*, o carrapato tropical de bovinos, parece não ser um vetor biológico do agente (Figueroa et al. 1998; Coronado 2001). No entanto, comparativamente, o potencial da transmissão biológica por carrapatos *D. andersoni* é cerca de duas vezes mais eficiente que transmissão mecânica realizada pela mosca *Stomoxys calcitrans* (Scoles et al., 2005).

Na transmissão vertical ou congênita, a prole se infecta ainda no útero de vacas infectadas (Aubry e Geale, 2011). A importância epidemiológica da transmissão vertical foi bastante questionada, mas sabe-se que é responsável pelos casos registrados de anaplasmoze neonatal congênita (Passos e Lima, 1984; Pypers et al., 2011). Segundo Silva e Fonseca (2014) o estado de imunossupressão transitório de vacas durante o parto poderia ser favorável a transmissão vertical, contribuindo para manutenção de *A. marginale* no rebanho e também à ocorrência de anaplasmoze aguda em vacas suscetíveis. Essa forma de transmissão parecia ocorrer em baixa frequência, pois foi caracterizada em apenas em 2,1% dos fetos provenientes de vacas portadoras (Ribeiro et al., 1995). Porém, recentemente a utilização de ferramentas de diagnóstico mais sensíveis, mostram que esse mecanismo de transmissão pode ser mais representativo, acontecendo com frequência relativamente alta (10%) em bezerros neonatos oriundos de área endêmica do estado de Minas Gerais e assim gerando perdas no rebanho que normalmente não são diagnosticadas (Meneses, 2013). Segundo Ribeiro et al., (1995) a frequência de anaplasmoze em bezerros lactentes no estado de Minas Gerais é alta, mesmo em situações na qual a população de vetores no ambiente é baixa sugerindo que as infecções congênitas podem desempenhar um papel importante na transmissão de *A. marginale*.

3.4. Ciclo biológico

O ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* no carrapato é complexo e se inicia quando o vetor ingere eritrócitos infectados durante seu ciclo de alimentação no bovino. Os eritrócitos infectados atingem o lume intestinal do carrapato e são fonte de infecção para células do intestino do artrópode. Após a replicação nessas células, vários outros tecidos são infectados, incluindo a glândula salivar. Nos carrapatos, *A. marginale* desenvolve colônias dentro de vacúolos intracitoplasmáticos. A primeira forma observada dentro das células de carrapatos infectados é a reticulada, que parece ser a forma vegetativa, na qual se divide por fissão binária. Em seguida, sofre mudanças para forma densa, que é a infecciosa e pode sobreviver no meio extracelular. A forma densa é transmitida aos hospedeiros vertebrados suscetíveis durante alimentação do carrapato por eliminação através das glândulas salivares (Kocan et al., 2003) (Figura 1).



Fonte: Adaptação de Kocan et al. (2003)

Figura 1: Ciclo biológico de *A. marginale* no hospedeiro bovino e em carrapatos.

Nos bovinos, os corpúsculos iniciais de *A. marginale* penetram nos eritrócitos através de um processo conhecido como rofeocitose, que consiste na invaginação da membrana plasmática das hemácias formando o vacúolo parasitóforo. No interior dos vacúolos os corpos iniciais multiplicam-se por fissão binária e posteriormente saem dos eritrócitos sem rompê-los por um processo de rofeocitose reversa, e iniciam novo ciclo de replicação ao penetrar em outro eritrócito por rofeocitose, podendo ser transferidos entre hemácias, através de pontes intercelulares (Ribeiro e Passos, 2002).

O período de incubação ou pré-patente é variável em função da dose infectante e oscila em torno de sete a 60 dias, com média de 28 dias. Após a detecção dos primeiros eritrócitos infectados seu número aumenta geometricamente (Kocan et al., 2010).

3.5. Patogenia e manifestações clínicas

A anaplasmose bovina se manifesta em um quadro clínico que é conhecido popularmente como “Tristeza Parasitária Bovina”, que consiste em um complexo de doenças causadas por infecções de vários hemoparasitos. No Brasil, os principais agentes etiológicos são *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* (Ribeiro e Passos, 2002).

Após a infecção ocorrem sucessivos ciclos de invasão, replicação e remoção de eritrócitos infectados ou não por fagocitose no sistema reticuloendotelial esplênico, o que leva a quadros de anemia branda à grave e icterícia na ausência de hemoglobinemias e hemoglobinúria. Os sinais clínicos podem também incluir febre, letargia, perda de peso, aborto e mortes (Kocan et al., 2003). Em um estudo retrospectivo (1986 a 2007) da casuística de bovinos atendidos na região de Botucatu-SP, os sinais clínicos predominantes foram apatia, hiporexia ou anorexia, desidratação, perda de peso e palidez das mucosas (Gonçalves et al., 2011). Normalmente as alterações clínicas são pouco perceptíveis no início da doença e somente se intensificam com o agravamento da anemia, que, geralmente, ocorre alguns dias após o nível máximo de riquetsemia (Coelho, 2007). Os casos de anaplasmose podem ser acompanhados ou não por febre, que se apresenta com aumento da temperatura corporal geralmente inferior a 40°C (revisado por Brown, 2012), podendo ser observada durante poucos dias concomitantemente à elevação da riquetsemia (Coelho, 2007). A febre representa uma resposta orgânica do animal à alguma substância estranha ao corpo, que pode ser derivada de microrganismos ou do próprio metabolismo que agem diretamente no centro hipotalâmico de controle da temperatura (Dirksen et al., 1993).

A doença manifesta-se na forma superaguda, aguda, crônica ou subclínica. Os casos superagudos são raros, mas fatais, com a morte ocorrendo dentro de poucas horas. Na forma aguda são observadas mucosas pálidas, os animais tornam-se deprimidos, anoréxicos e fracos. Ocorre redução na produção de leite, alguns animais desenvolvem febre e icterícia nas mucosas que é evidenciada posteriormente no curso da enfermidade (Waner et al., 2010). Durante a doença aguda, o número de eritrócitos infectados pode atingir níveis na circulação em torno de 10^9 por mililitro de sangue e reduções no hematócrito podem variar de 30 a 50% (revisado por Brown, 2012).

A doença crônica segue os casos agudos e pode persistir por vários meses, se caracterizando por anorexia, perda de peso, anemia e icterícia (Waner et al., 2010). Desse modo, a infecção aguda pode ser resolvida, mas nunca completamente eliminada, o que faz com que os animais permaneçam persistentemente infectados por toda a vida, com flutuação de riquetsemias oscilando entre 10^2 a 10^7 eritrócitos infectados por mililitro de sangue (revisado por Brown, 2012).

A intensidade e duração da doença é dependente principalmente do fator idade à primoinfecção. Bovinos adultos maiores que três anos de idade e sem contato prévio com o agente infeccioso são os indivíduos mais suscetíveis à manifestação grave e fatal da doença, enquanto que bezerros menores de ano de idade manifestam a doença de forma moderada (Ristic, 1968). A maior resistência dos animais jovens se deve a presença de anticorpos colostrais, maior eritropoiese da medula óssea, rápida resposta a imunidade celular e pela presença de hemoglobina fetal nos eritrócitos (revisado por Ribeiro e Passos, 2002).

3.6. Resposta imunológica contra *Anaplasma marginale*

A imunidade dos bovinos contra *A. marginale* é composta pela defesa humoral e celular. Assim, é necessária a ativação de linfócitos T CD4+ e a produção de anticorpos para atingir a proteção adequada contra a infecção (Palmer et al., 1999). Linfócitos T CD4+ são fundamentais nesse processo de imunidade por produzirem diversas citocinas, dentre as quais se destaca o interferon gama (IFN γ). Essa substância é responsável pelo aumento da atividade de macrófagos em reconhecer o antígeno opsonizado e na fagocitose destes, além de estimular a produção de óxido nítrico. O IFN γ age também sobre os linfócitos B, induzindo a produção de anticorpos do tipo IgG 2 que aumenta a capacidade de fagocitose por opsonização (Brown et al., 1998; revisado por Palmer et al., 1999; Araújo et al., 2003).

Os anticorpos produzidos durante infecção por *A. marginale* têm a função de opsonizar o microrganismo e assim facilitar a fagocitose por macrófagos. Além disso, podem impedir a invasão dos eritrócitos bovinos pelo bloqueio da aderência de corpúsculos iniciais (Brown, 2012). No entanto, isoladamente as imunoglobulinas são incapazes de garantir uma resposta imune efetiva contra a infecção, visto que o soro de animais imunes a anaplasmosose não conseguiu proteger os animais susceptíveis de manifestarem a doença (Gale et al., 1992; Brown et al. 2001).

Uma vez estabelecida, a infecção se mantém ao longo da vida do hospedeiro, pois *A. marginale* é capaz de resistir à defesa imunológica alterando a antigenicidade de algumas de suas proteínas principais de superfície (MSPs). A MSP2 é uma das principais proteínas relacionadas à variação antigênica, pois é codificada por uma família de genes polimórficos composta por vários pseudogenes funcionais e apresenta apenas um sítio de expressão. Dessa forma, após a fase aguda da doença é comum ocorrer a emergência de variantes de MSP2, o que justifica os picos de ricketsemia presentes na infecção persistente (Brown, 2012).

3.7. Medidas de controle

Atualmente as medidas de controle para a doença variam a variam com a situação epidemiológica do local. Entre elas inclui-se a manutenção do rebanho livre do agente, a aplicação de acaricidas, a quimioprofilaxia com antibióticos e imunização com vacinas vivas ou vacinas mortas (Kocan et al., 2000). A escolha de um método é influenciada pela disponibilidade, custo e aplicabilidade à epidemiologia da doença no local (Palmer, 1989)

Em regiões não endêmicas, o controle é realizado pela manutenção dos rebanhos livres de *A. marginale* restringindo a importação de animais portadores que poderiam servir como fonte de infecção (Kocan et al., 2000). O combate aos vetores artrópodes é considerado apenas como um modo parcial de controle, devido a variedade de formas que podem ocorrer a transmissão (Kocan et al., 2003). Além disso, é uma medida trabalhosa, tem alto custo, pode causar poluição ambiental e selecionar populações de moscas e carrapatos resistentes, além do risco de criar em áreas endêmicas para anaplasmosose, populações de bovinos adultos suscetíveis por ocasião da interrupção de sua aplicação (Kocan et al., 2000). O uso de antibióticos é indicado principalmente para os locais de estabilidade enzoótica onde a doença ainda constitui um

problema para os animais, porém se trata de uma estratégia economicamente dispendiosa e frequentemente não é aplicável para grandes rebanhos, além do risco que uso intensivo de tais medicamentos pode trazer pela seleção de microrganismos resistentes (Kocan et al., 2003).

A vacinação contra anaplasmose é considerada uma medida efetiva e de baixo custo. Existem dois principais tipos dessas vacinas, as vacinas mortas e as vacinas vivas. Ambas podem induzir imunidade protetora que reduz ou previne a doença clínica, mas nenhuma previne que os animais se infectem e se tornem persistentemente infectados (Kocan et al., 2003).

3.7.1. Vacinas mortas ou inativadas de *Anaplasma marginale*

As primeiras vacinas dessa classe foram desenvolvidas através de amostras inativadas de *A. marginale* obtidas de hemácias hemolisadas, sendo produzidas nos EUA na década de 60. Como as demais vacinas criadas anteriormente, esta também não impedia a infecção dos animais, mas foram capazes de aumentar a resistência dos bovinos e diminuir o número de mortes pela doença (Brock et al., 1965).

As vantagens do uso dessa vacina eram o menor risco de transmissão de outros patógenos por via sanguínea, baixo custo de estocagem e mínimas reações pós-vacinais. Como desvantagens, citam-se a necessidade de revacinações anuais, o alto custo para purificação do inóculo, falha na proteção cruzada entre áreas muito isoladas geograficamente e imunidade menos efetiva que as vacinas vivas (Kocan et al., 2010). Esta vacina foi amplamente comercializada na América do Norte, até que inconvenientes decorrentes da vacinação se mostraram. Foi observado que bezerros nascidos de mães vacinadas ocasionalmente apresentavam isoeritrólise neonatal, o que foi explicado pelo fato da vacina utilizada conter membranas de eritrócitos como contaminantes que sensibilizavam as vacas para produzir anticorpos contra grupos sanguíneos. Os anticorpos chegavam ao bezerro através do colostro e assim ocorria o quadro de isoeritrólise (Dennis et al., 1970). Posteriormente, esse problema foi resolvido com melhores métodos de purificação para produção da vacina que foi então comercializada até o fim da década de 90 (Kocan et al., 2000).

Nos últimos anos, testes com vacinas inativadas provenientes de amostras cultivadas *in vitro* de *A. marginale* se mostraram uma boa alternativa para evitar os problemas das vacinas que utilizam antígenos produzidos *in vivo* a partir de sangue infectado. Essa alternativa permitiu a obtenção do antígeno de forma econômica, com maior facilidade na padronização do inóculo e maior segurança por não conter outros agentes infecciosos e eritrócitos contaminantes (Kocan et al., 2001).

Kocan et al. (2001) utilizaram para produção de vacinas inativadas uma cultura de *A. marginale* em células embrionárias do carrapato *Ixodes scapularis*, denominadas IDE8. Os resultados do teste de imunização com essa vacina indicaram nível de proteção similar à premunicação com antígenos derivados de eritrócitos e os animais não apresentaram sinais clínicos após o desafio com sangue infectado. Em um experimento semelhante, de La Fuente et al. (2002) compararam a proteção conferida por dois tipos de vacinas inativadas, *A. marginale* cultivado em células

IDE8 e *A. marginale* purificado a partir de eritrócitos bovinos. O desafio aos animais foi realizado com carrapatos sabidamente infectados. A imunização com as duas vacinas provou ser eficiente de forma similar em inibir a sintomatologia da doença, levando a conclusão de que o inóculo cultivado em células de carrapato poderia substituir a vacina morta derivada de antígenos purificados do sangue.

Entretanto, Lasmar et al. (2012) avaliando a imunização de bezerros utilizando uma vacina morta de *A. marginale* produzida a partir de cultivos em células IDE8 observaram que os animais soroconvertiam em 14 dias após a segunda dose da vacina. Porém, não foi o suficiente para proteger contra a doença clínica e todos os bovinos necessitaram de tratamento para resistir à infecção causada pelo desafio com amostra de alta virulência (UFMG2), em sangue contendo aproximadamente 3×10^5 hemácias infectadas. Essa vacina apesar de promover a soroconversão, não foi eficaz na proteção dos animais, pois a imunidade contra anaplasose não depende apenas de resposta humoral, mas também de mecanismos celulares (Brown et al., 1998; de La Fuente et al., 2002). Outra razão para a falha vacinal seria a diferença observada na expressão dos antígenos de superfície, MSP1a e MSP1b, entre os organismos cultivados em células IDE8 e os obtidos a partir de eritrócitos. Os corpúsculos iniciais cultivados em células de carrapato expressam MSP1a de modo insuficiente quando comparado com corpúsculos oriundos de sangue infectado. Essa proteína é considerada importante na ativação de linfócitos CD4+ (Brown et al., 2001), o que poderia explicar a falha na proteção imunológica. Além disso, a falha da resposta imune em controlar a infecção nesse caso pode estar ligada às condições do experimento, no qual foi utilizado como desafio uma estirpe muito virulenta e em dose elevada, diferentemente de como ocorre na infecção natural (Lasmar et al., 2012).

Com a descoberta das proteínas principais de superfície (MSPs) presentes na membrana dos corpúsculos iniciais de *A. marginale*, pesquisas sobre a imunização contra anaplasose têm focado em tecnologias moleculares para produção desses imunógenos (Palmer et al., 1999). Diversas tentativas com vacinas de subunidades foram testadas, porém nenhuma promoveu proteção completa contra o desafio de cepas heterólogas (Palmer et al., 1989; Araújo, 2005; Dark et al., 2011). Porém, Silvestre et al. (2014) observaram que camundongos Balb/c inoculados com proteína MSP1a recombinante ligada a nanotubos de carbono produziram resposta imune humoral e celular de modo significativo, gerando uma nova possibilidade para a utilização desse imunógeno como componente de vacina inativada a ser testado em bovinos.

3.7.2. Vacinas Vivas

3.7.2.1. Vacina viva de *Anaplasma centrale*

Anaplasma centrale é uma riquetsia intra-eritrocitária que normalmente causa infecção branda em bovinos. Apesar de relatos escassos, casos clínicos com apresentação de sinais típicos de anaplasose aguda por *A. centrale* são descritos (Carelli et al., 2008). Apesar das diferenças na virulência esse agente é relacionado antigenicamente e molecularmente com *A. marginale*. Porém, de acordo com a classificação taxonômica atual, *A. centrale* é considerada uma espécie distinta e alternativamente uma subespécie de *A. marginale* (Kocan et al., 2003; Carelli et al., 2008).

O uso do isolado *A. centrale* vivo em animais suscetíveis a anaplasmoses é descrito como um dos mais antigos métodos de imunização, sendo usado desde 1911 quando Theiler isolou e observou que a amostra tinha baixa patogenicidade e conferia algum grau de imunidade contra a posterior infecção natural de *A. marginale* (Kocan et al., 2003). Desde então, essa vacina é utilizada em várias partes do mundo como África, Austrália, Israel e alguns países da América Latina, como Argentina, Brasil, Uruguai e Venezuela (revisado por Meléndez et al., 2003). Os Estados Unidos não utilizam essa vacina pelo fato de *A. centrale* não existir naturalmente no país e pelo risco de introdução de outros patógenos exóticos em seus rebanhos (Kocan et al., 2000).

Sabe-se que *A. centrale* e *A. marginale* compartilham antígenos determinantes de imunidade (Shkap et al., 1991; Kuttler, 1967). Entretanto, conforme Wilson et al. (1980) a proteção imunológica conferida pela vacina de *A. centrale* apresenta resultados variáveis, uma vez que não foi capaz de proteger 55,6% dos animais vacinados com a amostra de *A. centrale* usada na dose de 10^7 eritrócitos infectados por bovinos quando submetidos ao desafio experimental com *A. marginale*. A imunização com *A. centrale* também foi insuficiente para prevenir os efeitos de *A. marginale* em animais submetidos à infecção natural a campo (Payne et al., 1990).

Contudo, alguns trabalhos demonstram que a vacina apresenta resultados satisfatórios com relação à reação vacinal e à resistência ao desafio de *A. marginale* (Kessler et al., 1991; Vidotto et al., 1998). Tais variações na resposta vacinal cruzada podem estar relacionadas à diferença antigênica encontrada entre as cepas do desafio e vacinal, quando isoladas de áreas geográficas muito distantes (Kocan et al., 2000).

3.7.2.2. Vacina viva de *Anaplasma marginale* atenuado

A atenuação de *A. marginale* pode ser conseguida através de mutação induzida por radiação (Ristic et al., 1968) e passagens seriadas em animais que não são hospedeiros naturais da riquetsia como ovinos e cervídeos (Kuttler e Zaugg, 1988). Segundo Kessler et al. (1991) estirpes vivas atenuadas quando produzidas em condições controladas, livres de outros patógenos, podem ser uma solução eficiente e econômica para o controle de surtos e prejuízos em áreas de instabilidade enzoótica.

Porém, a efetividade dessa vacina é controversa, uma vez que nos ensaios vacinais as respostas variam quanto capacidade de proteger os animais vacinados contra o desafio de campo. Vilas Novas e Viana (1980) avaliaram bezerros que receberam esta vacina e observaram que a mesma conferiu proteção em 100% dos animais após o desafio a campo. No entanto, Kuttler e Zaraza (1969) concluíram que os bovinos vacinados não resistiram ao desafio com amostras de *A. marginale* da Colômbia, entretanto, foram resistentes a doença causada por uma amostra do Texas. No Brasil, Ribeiro et al. (1980) e na Colômbia, Zaraza e Kuttler (1971) relataram que a vacina não foi capaz de proteger os animais do desafio natural.

A explicação para a variação nos níveis de proteção induzida por vacinas atenuadas pode estar relacionada com variações antigênicas ou mesmo pelas diferenças na virulência das amostras de desafio (Ribeiro et al., 1980). Contudo, mesmo que a vacina induza imunidade efetiva por longo

período de tempo, em áreas de baixa endemicidade os animais devem ser revacinados após dez a 12 meses (Ribeiro e Passos, 2002).

3.7.2.3. Vacinas vivas de *Anaplasma marginale*

A imunização de animais com *A. marginale* vivo pode ser feita pela simples inoculação de sangue de um animal portador em animais susceptíveis (premunição clássica) ou pelo uso de inóculos padronizados de sangue infectado (premunição moderna) (Ribeiro e Passos, 2002). O uso de sangue de animais portadores de anaplasmoze não é recomendado, pois a dose infectante e a virulência da amostra são desconhecidas, além do risco de transmissão de patógenos como *Babesia* spp, *Trypanosoma* spp, *Brucella* spp, *Mycobacterium* spp., vírus da Diarréia Bovina e Vírus e Leucose Bovina, dentre outros (Rogers et al., 1988; Rodríguez et al., 2000).

As vacinas vivas oferecem a vantagem de incluir um conjunto completo de antígenos de superfície na sua conformação original e de apresentá-los ao longo do tempo (Hammac et al., 2013), além de estabelecerem imunidade permanente. Entretanto, têm a desvantagem de estocagem de alto custo e ocasionalmente induzir reações pós-vacinais indesejáveis (Meléndez et al., 2003). Para inibir os sinais clínicos causados pelo inóculo, os animais inoculados podem ser tratados com drogas específicas no momento em que for observado aumento de temperatura corporal, ricketsemia e diminuição no hematócrito (Ribeiro e Passos, 2002).

Ribeiro et al. (2003) verificaram que, em bezerros, o uso de inóculo padronizado com 10^7 corpúsculos de *A. marginale* (Am 98) associado ao tratamento com dihidrato de oxitetraciclina, administrado 28 dias após a inoculação, foi eficiente na prevenção contra os sinais clínicos da doença. Essa estratégia resultou em ricketsemia e a queda do volume globular significativamente mais brandos durante o desafio a campo, em comparação com o grupo controle não recebeu nada. É também descrito que a reação vacinal causada por uma amostra supostamente virulenta de *A. marginale* de Bogotá (Colômbia) foi leve, com diminuição de apenas 30% no hematócrito, porém suficiente para prevenir a doença quando os animais foram desafiados a campo (Zaraza e Kuttler, 1971).

Alternativamente ao uso de amostras naturais produzidas *in vivo*, Hammac et al. (2013) utilizaram como vacina a estirpe de *A. marginale* St. Maries viva, porém transformada geneticamente para expressão do marcador proteico GFP e cultivada em meio celular. Os animais vacinados apresentaram parâmetros clínicos melhores e foram protegidos contra o desafio homólogo.

Amostras vivas de *A. marginale*, porém naturalmente menos virulentas, têm mostrado resultados promissores na imunização contra anaplasmoze. Bastos et al. (2010) inocularam bezerros com uma amostra contendo aproximadamente 2×10^7 eritrócitos infectados por corpúsculos de *A. marginale* de baixa patogenicidade (UFMG 1). Após a infecção, os animais apresentaram queda média de 65% no hematócrito e ricketsemia média de 10,2%, mas os sinais clínicos foram brandos e não foi necessário o tratamento para a recuperação. Esses animais foram então desafiados com uma amostra de alta virulência (UFMG 2) na dose de 5×10^7 eritrócitos infectados e não manifestaram sinais clínicos da doença enquanto no grupo controle

houve redução média de 71% do hematócrito e riquetsemia média de 15,6%, resultando em 60% de mortalidade. O desenvolvimento de imunidade contra *A. marginale* possibilitou a resistência à amostra heteróloga, porém os animais se tornaram portadores das duas amostras inoculadas concomitantemente, comprovando a ausência do fenômeno de exclusão proposto por de la Fuente et al. (2003), para explicar a proteção contra anaplasnose conferida por cepas heterólogas.

A completa proteção conferida por UFMG 1 contra a amostra heteróloga de alta virulência UFMG 2 (Bastos et al., 2010) não ocorreu quando foi testada em comparação a *A. centrale*, quanto a capacidade proteger animais inoculados contra o desafio da estirpe heteróloga isolada de um local geograficamente mais distante (Israel). A infecção com UFMG 1 provocou mais sinais clínicos e induziu menores níveis de anticorpos que *A. centrale*, mas não foi necessário tratar os animais, porém a baixa patogenicidade do isolado de Israel não permitiu determinar se UFMG 1 é capaz de reduzir a doença fatal (Kenneil et al., 2013).

Recentemente, um isolado de *A. marginale* proveniente de um bezerro recém-nascido com transmissão vertical (UFMG 3) foi caracterizado por apresentar baixa virulência, assim como UFMG 1. Os animais inoculados com a amostra apresentaram hematócrito mínimo de 13,5% e riquetsemia máxima de 5,1% e nenhuma medicação foi necessária para recuperação. Dessa forma, UFMG 3 demonstrou potencial para ser usada como vacina viva, considerando a possibilidade de utilizar de uma dose infectante menor para amenizar os sinais clínicos e acelerar a recuperação dos animais (Meneses, 2013).

O principal obstáculo para vacinação efetiva contra anaplasnose é a limitada proteção cruzada entre as estirpes, visto que existe uma grande diversidade mundial e mesmo entre áreas menores (Almazan et al., 2008; Pohl et al., 2013). Apesar de eficazes em induzir imunidade, atualmente o uso das vacinas vivas se restringe a poucas propriedades devido a falta do inóculo no mercado e aos altos custos para sua produção e manutenção (Ribeiro et al., 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

PARTE I – EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

4.1. Local e período do experimento

As atividades de campo do experimento foram desenvolvidas do mês de outubro de 2013 a julho de 2014, em uma fazenda especializada na atividade leiteira intensiva localizada no município de Inhaúma/MG (19° 29' 27" Sul e 44° 23' 24" oeste) a 85 km de Belo Horizonte. O plantel da propriedade é composto predominantemente por animais da raça holandesa. As vacas em produção são confinadas em sistema free stall, as bezerras até o desmame em sistema de casinha sob piso de areia e as demais categorias criadas e mantidas em piquetes de tifton com suplementação de volumosos e concentrado no cocho. Esta propriedade possui um histórico de altas taxas de morbidade e mortalidade por tristeza parasitária bovina nos animais na fase de recria.

4.2. Inóculos de *Anaplasma marginale*

Dois isolados de *A. marginale* oriundos do estado de Minas Gerais foram utilizados neste trabalho. A amostra UFMG1 foi obtida a partir de sangue de um bezerro naturalmente infectado em Pará de Minas (Ribeiro et al., 1997), possui morfologicamente um apêndice e apresenta baixa virulência (Bastos et al, 2010). A amostra UFMG3 foi isolada de um bezerro com transmissão congênita de *A. marginale* e também caracterizada como de baixa virulência (Meneses, 2013). Estes estavam previamente caracterizados por meio de sequenciamento do gene responsável pela produção da proteína MSP1a e registrados no *GenBank* com os seguintes números: EU676176 (UFMG 1) e KF005076 (UFMG 3).

As duas amostras haviam sido previamente replicadas *in vivo* em bezerros esplenectomizados, negativos pela técnica de PCR para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*. O sangue desses animais, com alta riquetsemia, estava congelado em nitrogênio líquido, utilizando o DMSO como crioprotetor, e armazenado no Laboratório de Protozoologia Veterinária do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG até o momento da inoculação nos animais.

4.3. Aprovação pelo comitê de ética

As atividades desenvolvidas neste trabalho pertencem ao projeto submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG sob protocolo nº 357/2013 com validade até 11 de fevereiro de 2019.

4.4. Animais experimentais

Foram utilizadas 68 bezerras da raça holandesa, com idade inicial entre um e 43 dias de vida (média de 17 dias). Após o nascimento, os animais foram separados das mães e mantidos por 24 horas em baias coletivas com cama de feno, livres de carrapatos, para a realização dos cuidados iniciais com recém-nascidos (Figura 2 e Tabela 1). A cura do umbigo foi realizada com tintura de iodo 10%, duas vezes ao dia, durante cinco dias. Nas primeiras 12 horas de vida os animais receberam seis litros de colostro, divididos em duas refeições.



Figura 2: Instalações utilizadas para a realização de cuidados iniciais com os recém-nascidos utilizados nesse estudo na fazenda localizada no município de Inhaúma-MG no ano de 2013.

Os animais foram criados até atingirem 30 dias de vida em baias individuais de madeira, suspensas do chão, com fundo ripado e cama de feno (Figura 3A). A partir de um mês de vida as bezerras foram transferidas para um bezerreiro em sistema de casinha com piso de areia, onde permaneceram até o desaleitamento realizado aos 90 dias de vida (Figura 3B). Ambas as instalações não permitiam a infestação por carrapatos, mas apresentavam a presença de moscas hematófagas (Tabela 1).



Figura 3: Instalações utilizadas para bezerras deste trabalho até atingirem 30 dias de vida (A); Bezerreiro em sistema de casinha onde os animais em experimentação permaneceram dos 30 aos 90 dias de idade, quando foram desaleitados (B).

O aleitamento foi realizado até os 90 dias de idade, utilizando leite de descarte proveniente de vacas produzindo leite de transição e animais em tratamento de mastite. Até o quinto dia de vida os animais receberam seis litros de leite/dia; do 5º ao 20º dia de idade receberam oito litros/dia e do 20º ao 90º dia receberam dez litros/dia. O volume de leite diário foi dividido em duas refeições (às 07:00h e às 15:00h). A partir do 3º dia de vida, até a fase final de aleitamento, água e concentrado foram oferecidos *ad libitum*.

Após o desmame os animais foram transferidos para piquetes com área sombreada e com capacidade de lotação de 13 animais (Figura 4). A dieta foi oferecida no cocho em uma refeição diária, sendo o concentrado limitado a 1 kg/animal⁻¹ dia⁻¹ e o volumoso, *ad libitum*, constituído de silagem de milho e feno. A água também foi disponível *ad libitum* durante todas as fases de criação. Neste ambiente havia presença de carrapatos e por isso esses piquetes constituíram o local de desafio de infecção natural para os animais experimentais, que tiveram o primeiro contato com o vetor biológico tardiamente (Tabela 1).

Em todos os ambientes onde os animais permaneceram haviam moscas hematófagas que foram controladas por pulverização das casinhas com cipermetrina¹ e uso de mosquicidas² de forma esporádica conforme necessidade avaliada pelo veterinário e funcionários da fazenda.



Figura 4: Piquetes utilizados para recria dos animais utilizados no experimento após o desmame (90 dias). Os animais foram mantidos rotacionando em piquetes com ambiente semelhante durante toda a fase de desafio natural (durante quatro meses após o desaleitamento).

¹ Flytick® – Vallée

² Agita®10 WG – Novartis Animal Health

Tabela 1: Instalações, manejo e presença de vetores aos quais os animais do experimento foram submetidos durante a execução deste trabalho.

Ambiente	Tempo de permanência	Presença de vetores	Fase experimental
Baias coletivas com feno	Primeiras 24 horas de vida	Baixa presença de moscas	Cuidados com neonato
Baias individuais com piso ripado e cama de feno	Até 30 dias de vida	Moderada presença de moscas	Inoculações e monitoramento dos efeitos pós-vacinais
Bezerreiro em sistema de casinhas com piso de areia	Até o desaleitamento entre 31 e 90 dias de vida	Moderada presença de moscas	Inoculações e monitoramento dos efeitos pós-vacinais
Piquetes de recria	Nos primeiros quatro meses após o desaleitamento (de 91 a 210 dias de idade)	Moderada presença de moscas; carrapatos	Desafio natural

4.5. Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos e distribuídos igualmente entre os grupos os animais com diferentes idades. Estes animais foram submetidos a duas inoculações, por via subcutânea, intervaladas de 40 dias, seguindo o seguinte protocolo (Tabela 2 e Figura 5):

Tabela 2: Protocolos utilizados no presente estudo para as inoculações dos isolados de baixa virulência de *A. marginale* (UFMG1 e UFMG3) utilizados nas bezerras da raça holandesa com idade inicial entre um e 43 dias.

GRUPO	(n)	1ª DOSE	2ª DOSE
G1	15	2x10 ⁶ eritrócitos infectados pelo isolado UFMG 1	2x10 ⁶ eritrócitos infectados pelo isolado UFMG 1
G2	19	2x10 ⁶ eritrócitos infectados pelo isolado UFMG 3	2x10 ⁶ eritrócitos infectados pelo isolado UFMG 3
G3	17	2x10 ⁶ eritrócitos infectados pelo isolado UFMG 1	2x10 ⁶ eritrócitos infectados pelo isolado UFMG 3
G4	17	Solução salina (controle)	Solução salina (controle)

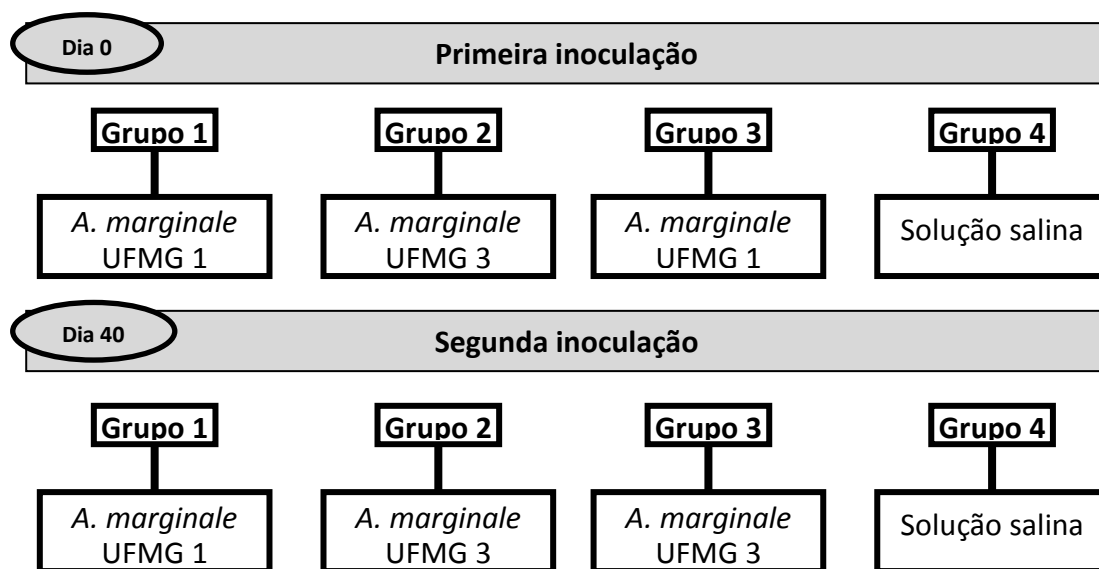


Figura 5: Organograma de inoculações realizadas neste experimento utilizando as amostras *A. marginale* (UFMG 1 e UFMG 3) em bezerras da raça holandesa com idade inicial entre um e 43 dias.

4.6. Coletas de sangue

Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 40 e 80, através de punção da veia jugular, em tubos contendo anticoagulante (EDTA) para obtenção de plasma e extração de DNA. Alíquotas de sangue total foram armazenadas em freezer -20°C para posterior análise molecular e detecção do DNA de *A. marginale* por meio da técnica de PCR. O plasma gerado foi obtido por meio de centrifugação a 1500G por 10 minutos e estocado a -20°C para posterior detecção de anticorpos específicos para *A. marginale*, através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

A coleta de sangue após o desafio natural, no dia 200, foi utilizada para confirmar a infecção pós-exposição aos vetores em animais anteriormente negativos nas PCR e verificar a manutenção do nível de anticorpos anti-*A. marginale* (Figura 6).

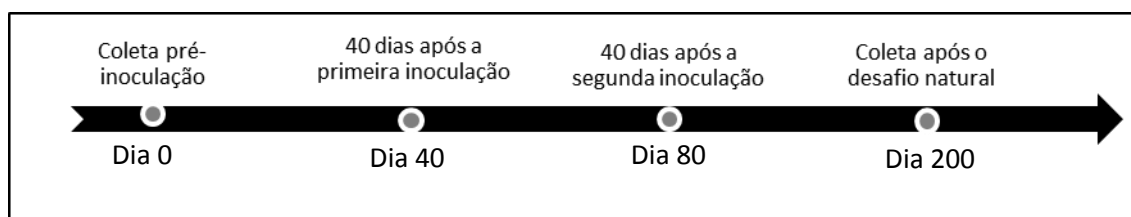


Figura 6: Fluxograma de coletas de sangue de bezerras da raça holandesa com idade inicial entre um e 43 dias, inoculados com amostras de *A. marginale* (UFMG1 e UFMG3).

4.7. Monitoramento dos animais

4.7.1. Efeitos pós-vacinais (virulência dos inóculos)

Após a primeira inoculação os bezerros foram inspecionados diariamente e temperatura corporal mensurada a cada dois dias (Dirksen et al., 1993). Em todo animal que apresentou hipertermia durante o acompanhamento foi realizado esfregaço de sangue de ponta de cauda para pesquisa de hemoparasitos.

Uma amostra de sangue de cada animal foi colhida semanalmente a partir da data da primeira inoculação até a terceira semana após, para determinação do volume globular através da técnica de microhematócrito (Schalm et al., 1975) e pesquisa de hemoparasitos através de esfregaço sanguíneo corado pelo kit Panótico Rápido ® Laborclin seguindo as recomendações do fabricante.

Após o 20º dia da primeira inoculação, as coletas de sangue em todos os animais para observação de hematócrito e esfregaço sanguíneo foram realizadas a cada dois dias a fim de verificar um possível decréscimo no volume globular e aumento de riquetsemia.

A riquetsemia de *A. marginale* foi quantificada por contagem dos eritrócitos infectados em microscopia óptica (100X), através da observação de 40 campos com celularidade homogênea. O resultado da contagem foi dividido por um valor estimado do total de células presentes nos campos observados. Essa estimativa se baseou na contagem de todas as hemácias (infectadas ou não) de um campo representativo de cada lamina. A contagem de eritrócitos desse campo foi então multiplicado por 40, obtendo-se o número total de hemácias observadas.

Os animais durante todo o período experimental não receberam nenhum medicamento a base de tetraciclina ou imidocarb, pois essas drogas poderiam interferir na replicação de *A. marginale* e assim comprometer a exposição antigênica e consequentemente a geração de uma resposta imunológica adequada.

Os animais que apresentaram hematócrito $\leq 18\%$ com riquetsemia patente ou riquetsemia por *A. marginale* $\geq 5\%$, foram tratados com enrofloxacina na dose de $7,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso corporal, via intramuscular, dose única (Facury Filho et al., 2012). Adicionalmente, quando foi necessário, foi realizado tratamento suporte através de hidratação enteral ou intravenosa para a correção dos desequilíbrios hidroeletrólítico e ácido-base.

4.7.2. Resistência ao desafio natural

Após o desmame os animais foram transferidos para piquetes com gramínea mantida baixa onde foram expostos em algum momento ao desafio natural devido a presença de carrapatos e moscas. Os bezerros continuaram sendo monitorados quanto aos mesmos parâmetros da fase anterior. O monitoramento foi realizado a cada dois dias durante um período de três meses e semanalmente no quarto mês de desafio. De modo similar, o tratamento antimicrobiano para anaplasmosose foi realizado utilizando os mesmos critérios da fase anterior.

PARTE II - ANÁLISES LABORATORIAIS

4.8. Locais

Os exames de esfregaço sanguíneo e microhematócrito foram realizados em laboratório montado na própria fazenda. Os exames laboratoriais de RIFI e PCR foram realizados no Laboratório de Protozoologia Veterinária e no Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte – MG, respectivamente.

4.9. Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)

O plasma obtido durante as coletas de sangue foi utilizado para detecção de anticorpos anti-*A. marginale* através da técnica da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), seguindo-se o protocolo laboratorial conforme Silveira (2012). O objetivo foi verificar a presença de anticorpos no momento pré-inoculação (Dia 0), a produção de anticorpos frente às inoculações (Dias 40 e 80) e a manutenção destes na circulação após o desafio no campo (Dia 200).

Foram utilizadas como antígeno da reação, lâminas de esfregaço sanguíneo espesso de bovino contendo eritrócitos parasitados por *A. marginale*, confeccionadas conforme IICA (1987). O plasma dos animais foi diluído em PBS 1x, na proporção de 1:40 e as lâminas foram incubadas à 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Amostras de plasma bovino positivo para *A. marginale* foram utilizados como controle positivo da reação e PBS 1x como controle negativo. Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS 1x e uma vez com água destilada, ambas por 3 minutos. Depois de secas à temperatura ambiente as lâminas foram incubadas à 37°C por 30 minutos, em câmara úmida, com anticorpo secundário anti-Bovino IgG conjugado com isotiocianato de fluoresceína Sheep anti-bovine IgG FITC (ABD serotec), diluído a 1:150 em azul de Evans. Após uma nova etapa de lavagem, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e cobertas com glicerina alcalina e lamínulas de vidro para avaliação qualitativa através da leitura em microscópio de epifluoresceína, em aumento de 20x e 40x

4.10. Análise Molecular

Amostras de sangue total coletadas durante o experimento foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR), com o objetivo de verificar a presença do DNA de *A. marginale*. Como controle positivo para a reação foram utilizadas amostras de DNA extraído de *A. marginale* cultivado em meio de células da linhagem IDE8 e como controle negativo foi utilizada água MiliQ ultrapura. Animais que se apresentaram positivos na PCR no dia 0 (pré-inoculação) foram excluídos da análise do experimento.

4.10.1. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue total foi realizada empregando o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), seguindo as recomendações do fabricante para 300µl de sangue.

4.10.2. Amplificação do DNA

O DNA extraído foi amplificado em termociclador automático (Eppendorf Mastercycler®). Foi realizada a técnica de PCR utilizando como alvo o gene *msp4* de *A. marginale* padronizada por de la Fuente et al. (2008) e reações de nested PCR (*nPCR*) para aumentar a sensibilidade da técnica conforme Silveira et al. (2012). Os iniciadores das reações e os produtos obtidos são descritos na tabela 3, os programas utilizados na tabela 4 e a condição para *nPCR* encontra-se na tabela 5.

Tabela 3: Sequência de iniciadores e produtos de cada reação para diagnóstico de *A. marginale*

Reação	Sequência (5' para 3')	Iniciador	Alvo	Produto (pb)	Referência
1ª reação	GGGAGCTCCTATGAATTACA GAGAATTGTTTACCCGGATC CTTAGCTGAACAGGAATCTT GC	MSP45 MSP43	<i>msp4</i>	872	de la Fuente et al. (2008)
2ª reação (<i>nested</i>)	CGCCAGCAAACCTTTTCCAAA ATATGGGGACACAGGCAAAT	AnapF AnapR	<i>msp4</i>	294	Silveira et al. (2012)

Tabela 4: Programa utilizado para realização de *nPCR* para identificação de *A. marginale*

Ciclo	Etapa	Temperatura (°C)	Duração
1 (1x)	Desnaturação inicial	94	5 min
2 (29x)	Desnaturação	92	1 min
	Anelamento	54	1 min
	Extensão	72	2 min
3 (1x)	Extensão final	72	8 min
4	<i>Hold</i>	12	---

Tabela 5: Condição para reação de *nPCR* para *A. marginale*

Reagente	Volume (μL): 1ª reação (<i>m_{sp4}</i>)	Volume (μL): 2ª reação (<i>m_{sp4}</i>)
GoTaq® Green Master Mix	7,5	7,5
H ₂ O MiliQ	5,4	5,4
Mix <i>primer</i> (F+R) (10mM)	0,6	0,6
DNA/produto 1ª reação	1,5	1,5
Volume final	15	15

4.10.3. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da *nPCR* das amostras e dos controles positivo e negativo foram misturados ao revelador GelRed (Biotium) diluído em água destilada, na proporção de 1:400 e posteriormente aplicados no gel de agarose 1% em meio de tampão (TAE 0,5X). Cada poço do gel recebeu a mistura de 5 μl do produto de amplificação da *nPCR* e 1 μl de GelRed. O padrão de peso molecular utilizado foi de 1Kb Ladder Plus (Fermentas). Os produtos correram no gel sob o potencial elétrico de 100 volts, por aproximadamente 30 minutos e posteriormente foram observados em lâmpada ultravioleta.

4.11. Análises estatísticas

Para as variáveis riquetsemia, temperatura retal e volume globular, o delineamento foi inteiramente ao acaso em parcelas subdivididas. Os tratamentos de G1, G2, G3 e G4 foram constituídos por 15, 19, 17 e 17 repetições (bezerros) respectivamente. As parcelas foram compostas pelos grupos (três grupos inoculados e um grupo controle não inoculado) e as subparcelas pelos dias referentes ao período de monitoramento dos efeitos pós-vacinais. Para análise das variáveis foram selecionados os tempos com maiores médias de riquetsemia. Essas variáveis não obedeceram aos princípios de normalidade e homogeneidade e as médias dos tratamentos foram comparadas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis. Para a comparação entre os tempos de avaliação de cada tratamento foi considerado o teste de Friedman. Os testes de Kruskal-Wallis e Friedman foram executados no software estatístico InfoStat versão 2008. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar as frequências dos animais que adoeceram e necessitaram de medicação assim como as frequências de diagnósticos obtidas no *nPCR* e RIFI utilizando software estatístico BioStat versão 2009. Para todos os testes foi considerado o nível de significância de $P \leq 0,05$ (Sampaio, 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeitos pós-vacinais

Na aplicação destas amostras de *A. marginale* no campo seria inviável selecionar para vacinação apenas os animais que não apresentam a infecção detectada por PCR, pois naturalmente é esperado que ocorram casos de transmissão vertical e portanto alguns animais estarão infectados ao nascimento. Na aplicação desses inóculos em condições de campo os animais tem que ser vacinados como um todo. Assim, os resultados abaixo serão apresentados, em um primeiro momento, as análises de todos os animais, ou seja, negativos e positivos na *nPCR* realizada no dia da inoculação e, em seguida, os dados apenas dos animais que eram naquele momento negativos na *nPCR*. A análise será realizada desta forma, pois a infecção natural prévia à inoculação poderia constituir um fator de interferência nos resultados obtidos.

5.1.1 Riquetsemia

Na análise dos dados de todos os animais, os três protocolos de inoculação utilizados apresentaram o primeiro diagnóstico de *A. marginale* através do esfregaço sanguíneo em momentos variáveis entre os animais, porém em média, foram bastante semelhantes entre os grupos, ocorrendo nos dias 47 e 48 após as inoculações (Tabela 6).

Tabela 6: Comportamento da riquetsemia em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de *A. marginale* (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental. Dados referentes a análise de todos os animais (Positivos e negativos na *nPCR* e apenas dos negativos na *nPCR*).

Grupo	<i>nPCR</i> no momento inicial (n)	Média de dias para o primo- diagnóstico	Frequência de animais com riquetsemia(%)	Frequência de animais positivos na <i>nPCR</i> e sem riquetsemia(%)	Média de riquetsemia máxima (%) no primeiro pico	Frequência(%) de animais que atingiram riquetsemia \geq 5%
G1	Pos+neg (15)	48 \pm 12,8	73,33	20	2,9 \pm 2,8	20
	Negativos (10)	52 \pm 14,20	60,00	30	2,2 \pm 2,3	10
G2	Pos+neg (19)	47 \pm 17,15	73,68	10,53	3,5 \pm 3,35	10,52
	Negativos (13)	47 \pm 18,39	69,23	15,8	4,31 \pm 4,0	15,38
G3	Pos+neg (15)	47 \pm 14,22	76,47	17,64	3,0 \pm 2,2	11,76
	Negativos (11)	40 \pm 8,30	63,63	27,27	3,4 \pm 2,45	9,09
G4	Pos+neg (15)	33 \pm 20,02	23,53	41,17	2,49 \pm 2,37	5,88
	Negativos (13)	41 \pm 29,70	15,38	46,15	2,61 \pm 2,7	0

A dose infectante é descrita entre os fatores que podem interferir no tempo de incubação de *A. marginale*. Gale et al. (1996) avaliando os efeitos de doses infectantes na ordem de 10^{10} , 10^8 e 10^6 eritrócitos infectados, pertencentes a mesma estirpe de *A. marginale*, observaram uma relação inversamente proporcional entre a concentração da dose e o tempo do período de incubação. Em condições experimentalmente controladas, o isolado UFMG 1 quando utilizado na dose 2×10^7 eritrócitos infectados apresentou um período de incubação de 24 dias (Bastos et al., 2010) e na dose 10^7 esse período foi de 35 dias (Coelho, 2007). Sob as mesmas condições experimentais, a amostra UFMG 3 ao ser inoculada na dose de 2×10^7 apresentou período de

incubação de 20 dias (Meneses, 2013). Enquanto isso, nas condições ambientais de campo desse experimento o período para visualização dos primeiros corpúsculos iniciais foi mais prolongado para as amostras UFMG 1 e UFMG 3, provavelmente devido ao uso de uma dose infectante 10 vezes menor que o utilizado nos trabalhos anteriores, sendo essa a dose infectante mínima para *A. marginale* descrita por Todrovic et al. (1978). Os dados aqui apresentados mostram que a dose infectante de 2×10^6 eritrócitos infectados foi efetiva quando aplicada por via subcutânea, o que não corrobora com o trabalho de Todrovic et al. (1978) que relata efetividade apenas quando essa dosagem foi administrada por via intravenosa. Esta informação é importante para a utilização desses inóculos como vacina no campo, pois a via intravenosa representa um fator complicador pela maior dificuldade de aplicação e pelo risco de reações anafiláticas.

Além da dose infectante, a via de inoculação subcutânea aqui utilizada diferiu dos trabalhos de Bastos et al., 2010, Coelho, 2007 e Meneses, 2013 que utilizaram em suas pesquisas a via intravenosa para inoculação das amostras de *A. marginale* aqui utilizadas. A via de inoculação também é descrita como um fator que pode interferir no período de incubação de *A. marginale* como foi demonstrado por Todrovic et al. (1978) quando inocularam *A. marginale* na dose de 2×10^7 eritrócitos infectados por via intravenosa ou subcutânea e observaram que havia diferenças no período de incubação. Essa dosagem administrada por via intravenosa apresentou período médio de 17 dias enquanto que na aplicação por via subcutânea esse período foi de 30 dias em média. Desse modo, a via utilizada para as inoculações do presente estudo foram também responsáveis pela observação de um período de incubação mais prolongado para as amostras de *A. marginale* aqui estudadas.

A frequência de animais com riquetsemia observada nos esfregaços sanguíneos durante o monitoramento das inoculações do G1, G2 e G3, variou entre 73,3% e 76,5%, com alguns animais inoculados não apresentando riquetsemia patente em nenhum momento como pode ser observado na tabela 6. Esses resultados corroboram com o que foi verificado por Corrier et al. (1980), em que 6,89% dos bezerros inoculados com uma amostra de baixa virulência de *A. marginale* e 10,34% que receberam uma amostra atenuada do microrganismo não tiveram riquetsemias detectáveis pelo esfregaço sanguíneo após a imunização. Apesar disso, os resultados desse trabalho confirmam que os métodos de inoculação são capazes de produzir uma infecção ativa de *A. marginale*. Esta infecção ativa é necessária para a efetiva estimulação do sistema imunológico e proteção contra subseqüentes infecções com estirpes de campo (Carson et al., 1977).

O grupo controle apresentou 23,53% dos animais diagnosticados com riquetsemia proveniente de infecção natural no mesmo período. O mais provável é que a transmissão tenha ocorrido mecanicamente através de picadas de moscas hematófagas, que estavam presentes em quantidade moderada nos ambientes onde ficaram os animais nessa fase do experimento e onde também os carrapatos estavam ausentes. Essa forma de transmissão é considerada a principal via de disseminação da riquetsia em certas áreas dos EUA, América Central, América do Sul e África, onde não existem os vetores biológicos (Ewing 1981; Foil 1989). Possivelmente a taxa de infecção natural que ocorreu no grupo controle foi influenciada pelas inoculações, visto que animais inoculados e não inoculados foram mantidos no mesmo ambiente em proximidade, favorecendo a disseminação de *A. marginale* dos animais inoculados que passavam por riquetsemia para os animais não inoculados (controle). É relevante também destacar que a via mecânica de infecção através de moscas não foi abrangente o suficiente, demonstrando então a necessidade de inocular todos os animais.

Todos os animais que apresentaram riquetsemia identificada no esfregaço sanguíneo também foram diagnosticados positivos pela técnica de técnica de *nPCR*. Mas como pode ser visto na tabela 6 alguns animais nos quais não foi observada riquetsemia durante o monitoramento dos efeitos pós-vacinais (dia 0 ao dia 80 do experimento) foram positivos na *nPCR*, corroborando com Pohl et al. (2013) que demonstram a sensibilidade superior da técnica de PCR frente a técnica de leitura de esfregaços sanguíneos para detectar a infecção por *A. marginale*. Na análise dos animais *nPCR* negativos todos os animais que apresentaram riquetsemia tornaram-se *nPCR* positivos. A técnica de *nPCR* também se mostrou mais sensível que a observação microscópica de esfregaços para o diagnóstico da infecção de *A. marginale* como pode ser observado pela frequência de animais positivos na *nPCR* sem apresentar riquetsemia no esfregaço (Tabela 6).

Os animais inoculados mostraram em média riquetsemias máximas bastante semelhantes, atingindo em média entre 2,9% e 3,5% de eritrócitos infectados (Tabela 6). Com a amostra UFMG1 aplicada na dose de 10^7 eritrócitos infectados por animal, Coelho (2007) observou um pico médio de 7,3% de riquetsemia, enquanto Bastos et al. (2010) verificaram ocorrência de riquetsemia máxima de 10,2% em animais inoculados com 2×10^7 eritrócitos infectados com o isolado UFMG 1. Meneses (2013) quando utilizou a amostra UFMG 3 na dose de 2×10^7 hemácias infectadas por animal constatou riquetsemias máximas de 3,78% e 5,1%. As maiores riquetsemias observadas dos grupos inoculados foram baixas em comparação com trabalhos anteriores que utilizaram inoculações experimentais da estirpe UFMG 1. Porém, estes dados foram próximos à riquetsemia caracterizada para UFMG 3 (Meneses, 2013). A maior semelhança dos níveis de riquetsemia deste trabalho com o trabalho de Meneses (2013) pode ter ocorrido em virtude do uso da mesma metodologia de contagem microscópica, descrita no material e métodos, que diferiu em relação aos trabalhos anteriores.

Considerando apenas os animais previamente *nPCR* negativos às inoculações, na tabela 6 pode-se observar que o G1 foi o grupo que apresentou maior tempo para o primeiro diagnóstico através do esfregaço sanguíneo e também apresentou a menor média de riquetsemia máxima no primeiro pico de riquetsemia, o que reafirma o comportamento do isolado de *A. marginale* UFMG 1 aplicado em duas doses homólogas nesse grupo como uma amostra pouco virulenta. Os demais grupos inoculados (G2 e G3) também apresentaram um período de incubação prolongado, porém ligeiramente mais curtos que o G1. No entanto, os animais destes grupos que apresentaram riquetsemia observada em esfregaços sanguíneos, em média tiveram riquetsemias máximas no primeiro pico mais elevadas, com destaque para o G2 no qual 15,38% dos animais atingiram 5% de riquetsemia, um dos limites estabelecidos na metodologia para tratamento específico contra *A. marginale*.

Apesar de visivelmente distintas, as riquetsemias estimadas por contagens de eritrócitos infectados de UFMG 1 e UFMG 3 dos trabalhos anteriores foram consideradas baixas em comparação aos resultados obtidos pela inoculação da amostra de alta virulência (UFMG 2). Bastos et al. (2010) constaram riquetsemia média de 15,6% quando utilizaram a dose infectante de 5×10^7 eritrócitos infectados por *A. marginale* - UFMG 2 e Lasmar et al. (2012), com este mesmo isolado em uma dose inferior (3×10^5), encontraram riquetsemia média máxima de 10,4%. Dessa forma, os resultados de riquetsemia dos isolados UFMG 1 e UFMG 3 utilizados nas condições de manejo, ambiente e dose infectante desse trabalho reafirmam a característica de baixa virulência das amostras.

A frequência de animais que apresentaram riquetsemias a níveis $\geq 5\%$ e necessitaram ser tratados com antibiótico conforme a metodologia deste trabalho foi baixa (Tabela 6). Como pode ser observado na tabela 6, o G1 foi o grupo que apresentou o maior número de animais com riquetsemia atingindo o limiar de 5% estabelecido, seguido pelo G3, G2 e G4.

A riquetsemia apresentada pelos animais nos diferentes grupos foi bastante variável (CV > 340,52%) e de baixa intensidade, determinando a ocorrência de poucos casos que necessitaram de tratamento específico. Os níveis de riquetsemia entre os grupos diferiram apenas entre os dias 56 e 60 do experimento, conforme a figura 7. Nestes momentos G3 apresentou valores significativamente maiores que o controle (G4), porém iguais aos demais tratamentos (G1 e G2). Destaca-se que, apesar da ocorrência de diferentes riquetsemias nestes momentos, todas foram de baixa intensidade. Essa elevação da riquetsemia pode ter sido causada pela aplicação da segunda dose com amostra UFMG 3 nesses animais que haviam recebido a amostra UFMG 1 na primeira dose, pois o aumento da riquetsemia ocorreu entre 16 e 20 dias após a administração de UFMG 3, corroborando com o período de incubação de 20 dias desse isolado caracterizado por Meneses (2013).

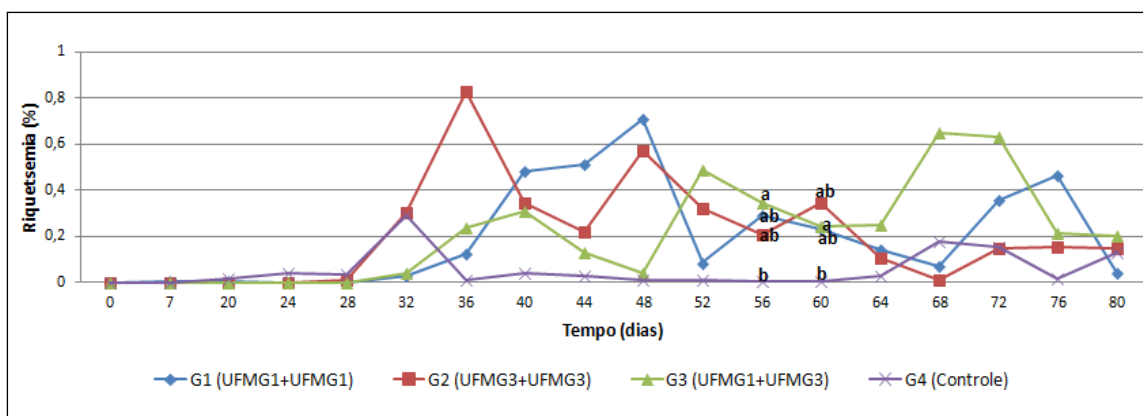


Figura 7: Dinâmica das riquetsemias durante o tempo de avaliação dos efeitos pós-vacinais (0 a 80 dias do experimento). Os valores representam as médias de riquetsemia em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de *A. marginale* (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental. Médias com letras diferentes representam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os grupos.

Considerando apenas os animais *n*PCR negativos previamente as inoculações, os níveis de riquetsemia média dos grupos no período de avaliação das inoculações (dia 0 ao dia 80) diferiram significativamente apenas entre os dias 52, 56 e 60 do experimento, conforme a figura 8. Nestes tempos, assim como na análise apresentada anteriormente o G3 apresentou valores significativamente maiores que o controle (G4), porém iguais aos demais tratamentos (G1 e G2).

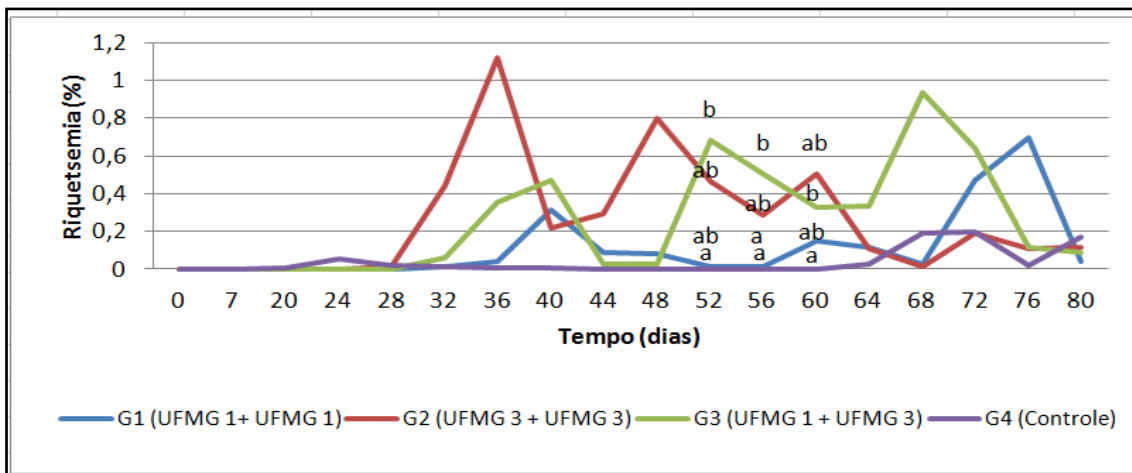


Figura 8: Dinâmica das riquetsemias durante o tempo de avaliação dos efeitos pós-vacinais (0 a 80 dias do experimento). Os valores representam as médias de riquetsemia em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de *A. marginale* (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental. Médias com letras diferentes representam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os grupos. Nessa análise foi considerado apenas os animais *n*PCR negativos antes da primeira inoculação.

Na figura 9 pode-se observar entre os dias de avaliação no G1 um aumento significativo da riquetsemia entre os dias 44 e 48 do experimento. Após esse aumento, a riquetsemia apresentou queda acentuada, mas se manteve em níveis menores por um período de 16 dias e retornou a níveis representativos no dia 64. Enquanto isso, no G2 o aumento de riquetsemia foi mais precoce, ocorrendo um pico entre os dias 36 e 48 e outro entre os dias 64 e 80. Entre estes picos foi observado um intervalo de 16 dias com riquetsemia baixa.

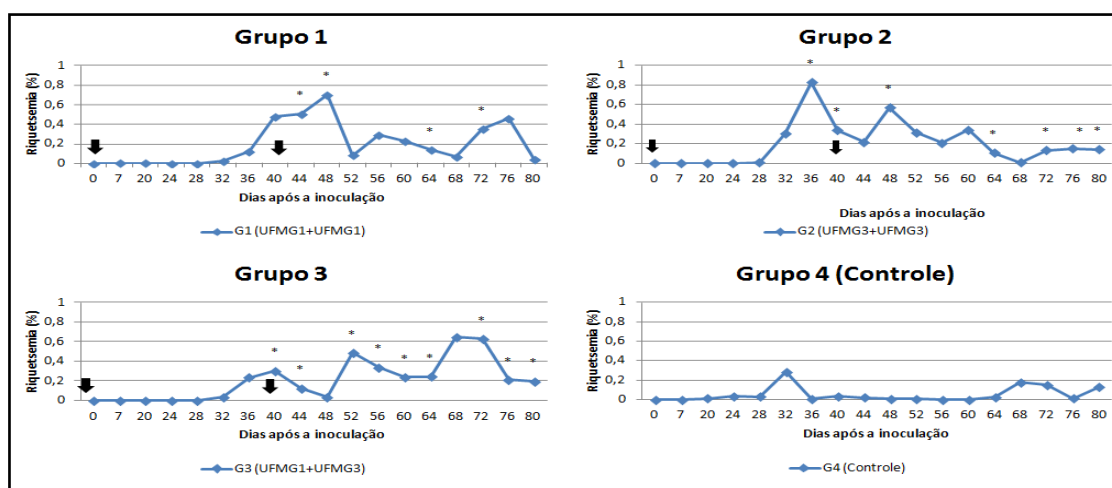


Figura 9: Avaliação dos efeitos pós-vacinais (riquetsemia média de *A. marginale*) em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: UFMG 3 + UFMG 3; G2: UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental. As setas indicam o momento das inoculações e os asteriscos indicam os dias em que houveram aumentos de riquetsemia ($p < 0,05$).

No G3, os níveis de riquetsemia começaram a aumentar a partir do 40º dia após a inoculação e ao contrário dos outros grupos inoculados, a riquetsemia se manteve mais alta até o octogésimo dia, no entanto, sempre de baixa intensidade. Esse resultado pode ser explicado pelo fato dos animais deste grupo terem recebido na segunda inoculação uma amostra de *A. marginale* heteróloga em relação à primeira dose. Assim, a diferença antigênica entre os isolados pode ter contribuído para a manutenção da riquetsemia em níveis consideráveis, causando a ausência do intervalo de riquetsemias, como observado nos grupos G1 e G2 que foram inoculados com isolado homólogo. O grupo controle (G4), apesar da ocorrência de infecção natural em alguns animais, não mostrou diferenças significativas nos níveis de riquetsemia entre os tempos de avaliação e mostrou baixa riquetsemia porque provavelmente foi infectado naturalmente com as amostras UFMG 1 e UFMG 3, e não amostras de campo (Figura 9).

Para os animais que estavam negativos na *n*PCR no início do trabalho, entre os dias de avaliação no G1 foi observado nesta análise um aumento significativo da riquetsemia no dia 48 do experimento. Posteriormente, a riquetsemia diminuiu, mas se manteve em níveis menores por um período de 16 dias e retornou a níveis representativos no dia 64. No G2 a riquetsemia aumentou significativamente nos dias 48 e 52, e apresentou outra elevação entre os dias 64 e 80, entre essas observações verificou-se um intervalo de 12 dias com riquetsemia baixa. No G3, os níveis médios de riquetsemia se tornaram significativos no 40º dia após a inoculação, em seguida apresentaram queda e voltaram a níveis representativos do dia 52 ao dia 60 do experimento. No grupo controle apesar de 15,38% dos animais terem sofrido infecção natural no ambiente por picada de moscas, a média da riquetsemia do grupo não atingiu níveis que diferiram significativamente (Figura 10).

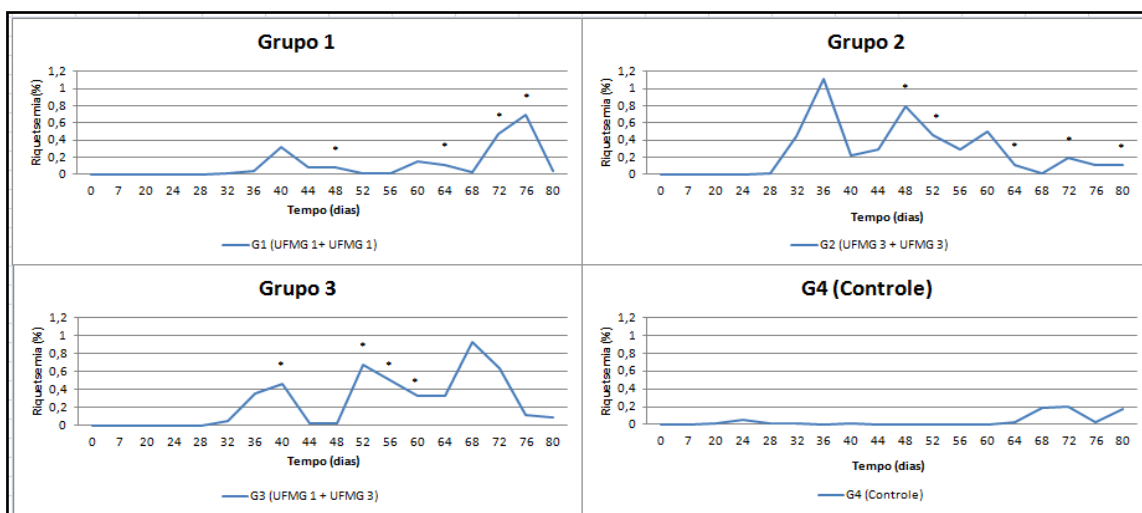


Figura 10: Avaliação dos efeitos pós-vacinais (riquetsemia média de *A. marginale*) em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: UFMG 3 + UFMG 3; G3: UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental). Os asteriscos indicam os dias em que houveram aumentos de riquetsemia ($p < 0,05$). Nessa análise foram considerados apenas animais *n*PCR negativos na primeira inoculação.

5.1.2 Temperatura Retal

A oscilação de temperatura retal média dos grupos foi pequena durante o período experimental e se manteve dentro dos limites fisiológicos estabelecidos para bezerros (38,0 a 39,5°C) (Dirksen et al., 1993), não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 11). De uma forma geral, observou-se um declínio da temperatura a partir do 40º dia do experimento. Esse fato pode ser explicado levando em consideração a idade dos animais (média de 57 dias de vida), uma vez que animais jovens, fisiologicamente, apresentam a temperatura interna mais elevada devido ao centro termoregulador não estar completamente desenvolvido e pelo elevado metabolismo que os animais apresentam nessa idade (Feitosa, 2008).

A frequência de animais com hipertermia (temperatura retal superior a 39,5°C) foi baixa (Tabela 7) e não elevou a média observada nos grupos (Figura 11). No G1 a maior frequência foi observada no início do aumento da ricketsemia (dia 32), enquanto no G2 e G3 a maior frequência de hipertermia se deu no pico das ricketsemias (40 e 44 dias). Outra onda de hipertermia foi observada no segundo pico de ricketsemia, entre os dias 76 e 80 em todos os grupos inoculados. No grupo controle foi observada maior frequência de hipertermia no dia 32 coincidentemente com o pico de ricketsemia causado pela infecção natural. Em média a hipertermia foi mais frequente nos animais do G2 (13,16% ± 8,5), seguido pelo G3 (9,80% ± 6,9), G1 (8,89% ± 7,9) e G4 (4,24% ± 4,8). Como pode ser observado na tabela 7 e figura 9, houve maior frequência de hipertermia concomitante à elevação da ricketsemia. Apesar de a hipertermia ser descrita entre as principais alterações clínicas apresentadas pelos animais acometidos por tristeza parasitária bovina (Gonçalves et al., 2011), de acordo com Brown (2012), os casos de anaplasmoze podem ou não ser acompanhados por febre; e quando observada, acontece durante poucos dias concomitantemente à elevação da ricketsemia (Coelho, 2007), corroborando com os achados aqui descritos. A presença de pirógenos exógenos circulantes no organismo como vírus, bactérias, fungos, protozoários e antígenos são responsáveis por promover a liberação de citocinas armazenadas nos leucócitos, macrófagos, monócitos ou células de Kuppfer, essas substâncias agem alterando o centro regulador hipotalâmico causando a elevação da temperatura corporal (Feitosa, 2008).

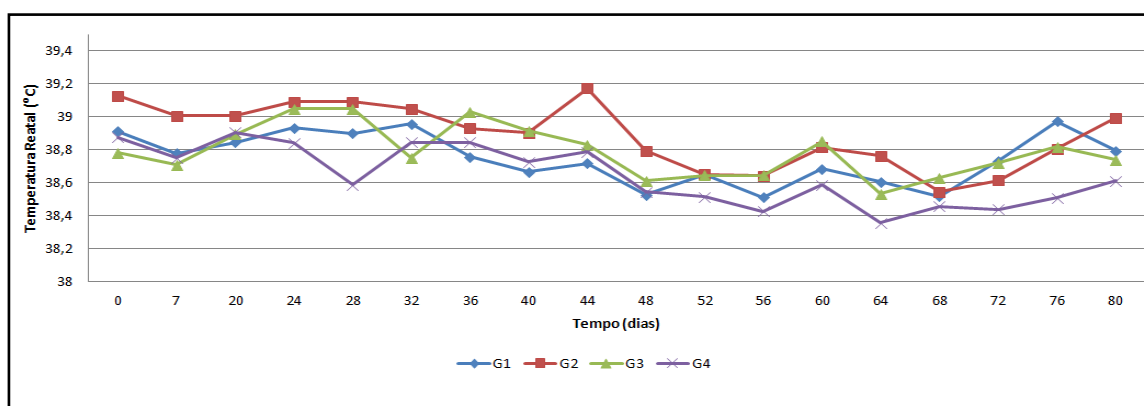


Figura 11: Dinâmica da temperatura retal durante o tempo de avaliação dos efeitos pós-vacinais (0 a 80 dias do experimento). Os valores representam as médias de temperatura retal em bezerros de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de *A. marginale* (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental).

Tabela 7: Frequência (%) de hipertermia durante o tempo de avaliação dos efeitos pós-vacinais (0 a 80 dias do experimento) em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de *A. marginale* (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental).

Grupos	Dias do experimento																		Média
	0	7	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	
G1	6,7	0,0	0,0	13,3	6,7	20,0	6,7	6,7	6,7	0,0	6,7	6,7	6,7	0,0	6,7	26,7	20,0	20,0	8,89
G2	15,8	5,3	15,8	21,1	5,3	15,8	15,8	21,1	31,6	15,8	5,3	21,1	5,3	10,5	0,0	0,0	10,5	21,1	13,16
G3	11,8	0,0	11,8	11,8	11,8	5,9	11,8	17,7	17,7	0,0	5,9	0,0	17,7	5,9	0,0	11,8	23,5	11,8	9,80
G4	11,8	0,0	0,0	0,0	5,9	11,8	5,9	0,0	11,8	11,8	5,9	0,0	0,0	0,0	5,9	5,9	0,0	0,0	4,24

Com relação aos animais *n*PCR negativos antes da primeira inoculação, a temperatura retal média dos grupos variou pouco durante o período experimental e se manteve dentro dos limites fisiológicos estabelecidos para bezerras (38,0 a 39,5°C) (Dirksen et al., 1993), não sendo possível observar diferenças significativas entre os grupos (Figura 12). Do mesmo modo que na análise que considerou todos os animais do trabalho, nesta análise que excluiu os animais inicialmente *n*PCR positivos, observou-se em todos os grupos uma tendência de queda da temperatura retal a partir do 48º dia do experimento e possivelmente aconteceu em virtude da idade dos animais avaliados como discutido anteriormente,.

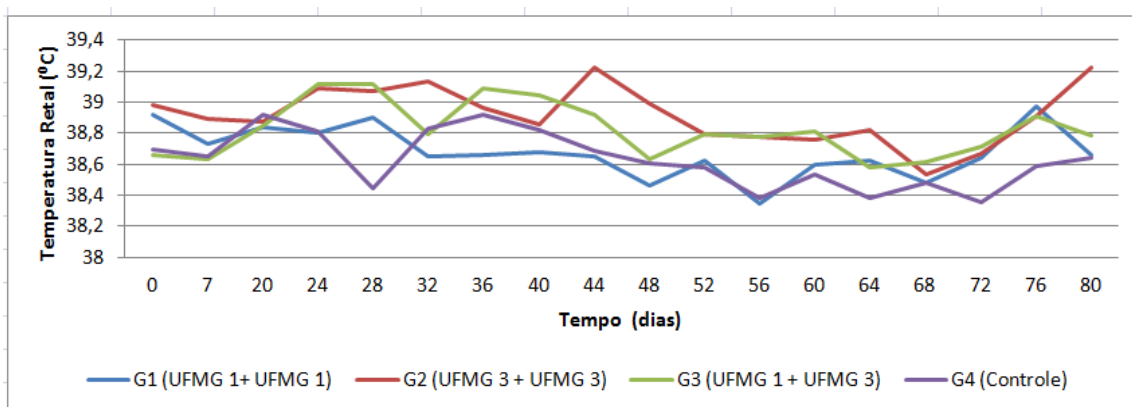


Figura 12 Dinâmica da temperatura retal durante o tempo de avaliação dos efeitos pós-vacinais (0 a 80 dias do experimento). Os valores representam as médias de temperatura retal em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de *A. marginale* (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental). Nessa análise foram considerados apenas os animais *n*PCR negativos antes da primeira inoculação.

5.1.3 Volume Globular

Não foram observadas alterações significativas no volume globular dos animais inoculados. A faixa etária na qual os bezerras foram inoculados foi favorável à recuperação dos animais devido à eritropoiese intensa nessa fase. De acordo com Caxito (2013) bezerras no segundo mês

de vida apresentam uma condição transitória de hiperplasia eritróide com o aumento simultâneo do hematócrito.

Em média, os valores de volume globular oscilaram discretamente e se mantiveram no decorrer dos dias avaliados dentro dos limites fisiológicos entre 24% a 46% (Schalm et al., 1975). Porém, no dia 56 do experimento, os animais do G1, G2 e G3 apresentaram valores significativamente inferiores ao observado no grupo controle (G4) (Figura 13). No dia 72, esta diferença se manteve em relação aos grupos G1 e G4. Estes resultados possivelmente são um reflexo do primeiro e do segundo pico de riquetsemia observado nos grupos inoculados (Figura 9), pois de acordo com Coelho (2007) o pico de riquetsemia máxima antecede a observação dos menores valores de volume globular.

As inoculações determinaram que o comportamento do volume globular fosse diferente entre os animais controles e vacinados. O aumento de hematócrito observado apenas no grupo controle a partir do dia 56 acontece fisiologicamente e corrobora com Caxito (2013). Segundo Brum-Hasen et al. (2006) isto possivelmente se trata de um mecanismo compensatório ao decréscimo no tamanho médio das hemácias durante os primeiros três a quatro meses de vida do bezerro, que ocorre devido a substituição de hemácias contendo hemoglobina fetal, por hemácias menores contendo hemoglobina de adulto (Jain, 1986).

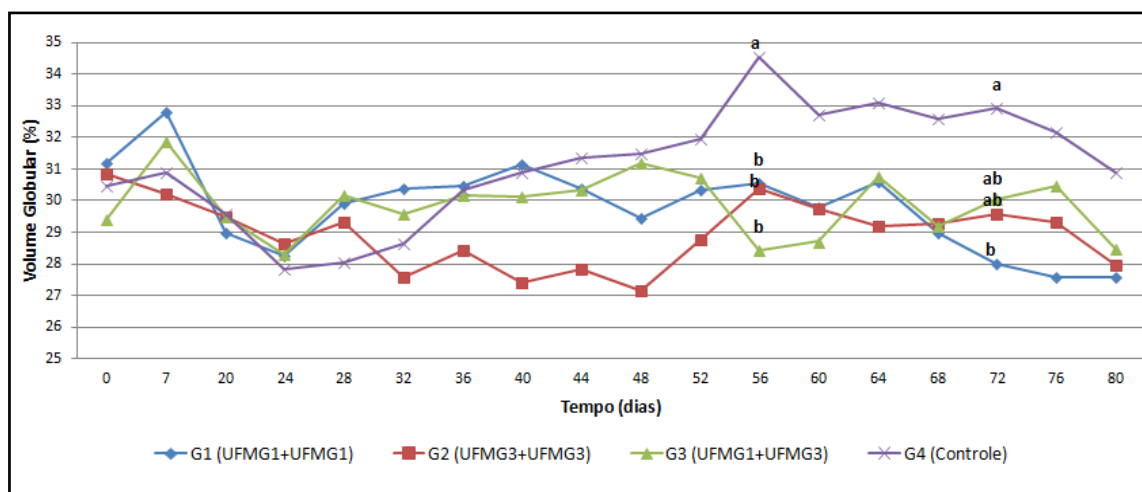


Figura 13: Dinâmica do volume globular durante o tempo de avaliação dos efeitos pós-vacinais (0 a 80 dias do experimento). Os valores representam as médias de volume globular em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de *A. marginale* (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental. Médias com letras diferentes representam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os grupos.

Entre os animais inoculados, as maiores médias de redução de hematócrito durante o primeiro pico de riquetsemia foram observadas nos animais do grupo G2 ($41\% \pm 14,29$), seguido pelo grupo G1 ($33\% \pm 12,1$), G3 ($24\% \pm 13,96$) e G4 ($27\% \pm 12,30$), respectivamente. Trabalhos anteriores que realizaram inoculações experimentais de *A. marginale* demonstraram uma associação entre a redução do hematócrito e a elevação da temperatura retal (Lasmar, 2010; Meneses, 2013). Apesar dos animais do grupo G2 apresentarem uma maior média de redução

do hematócrito, assim como maior frequência de hipertermia (tabela 7), as médias do volume globular obtidas nos tempos avaliados se mantiveram acima de 24%, dentro dos parâmetros fisiológicos da espécie, não caracterizando um processo anêmico que abrangente a todo o grupo.

Uma relação entre a diminuição do hematócrito e a elevação da riquetsemia é descrita para os isolados de *A. marginale* utilizados nesse trabalho. Após a inoculação de 2×10^7 hemácias infectadas com *A. marginale* UFMG 1, Bastos et al. (2010) observaram o desenvolvimento de riquetsemia média de 10,2%, com 63% de redução do hematócrito. Kenneil et al. (2013) também utilizando a amostra UFMG 1 na dose infectante 1×10^6 eritrócitos infectados descreve média de 10% de riquetsemia e 39,4% de diminuição de hematócrito. Para a amostra UFMG 3, Meneses (2013) relata o volume globular de 13,5% como menor valor obtido durante o experimento.

Embora essa relação seja bem determinada, nos presentes resultados ela não se apresentou de forma intensa, pois a média dos hematócritos não variou significativamente entre os tempos avaliados (Figura 14). Possivelmente a associação dessas variáveis foi influenciada pelo tratamento de todos os animais que atingiram o volume globular de 18% ou menos, conforme o critério estabelecido na metodologia. Porém, como o número de animais que necessitaram de medicamento por efeito das inoculações foi relativamente baixo é suposto que as amostras de *A. marginale* UFMG 1 e UFMG 3 não induzam grandes alterações nesse parâmetro quando utilizadas nas condições experimentais do presente trabalho. Destaca-se ainda o fato de que estas inoculações desencadearam riquetsemias baixas que não influenciaram intensamente alterações no volume globular.

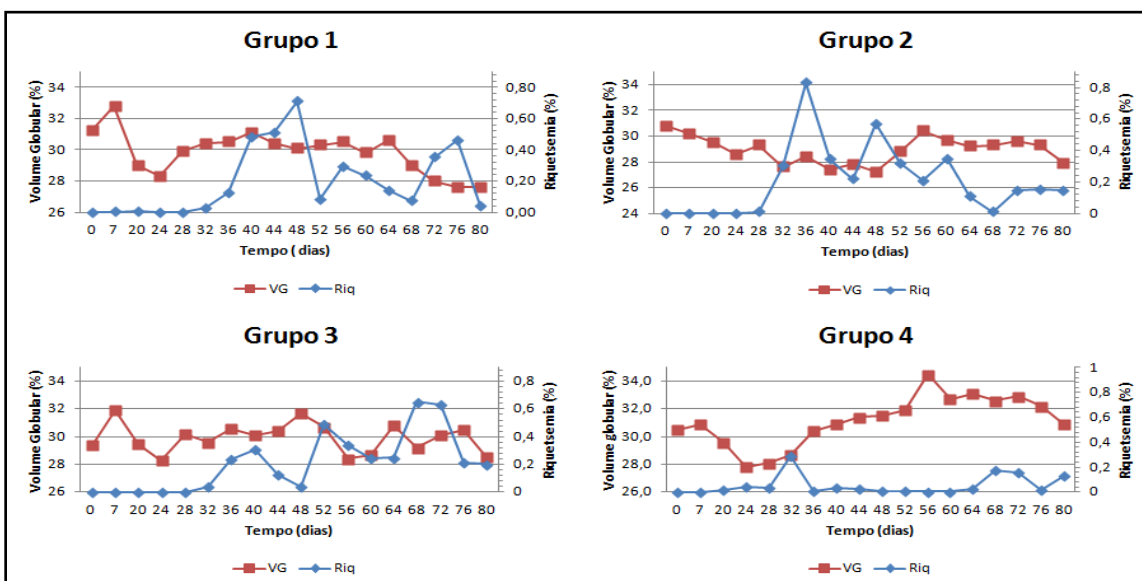


Figura 14: Associação entre as médias de volume globular (VG) e as médias de riquetsemia (Riq) observados em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de *A. marginale* (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental).

Nas condições deste trabalho, é importante considerar que as quedas de volume globular podem ser consequência de outras causas além da anaplasnose. Durante esse projeto foram observadas outras causas de queda do hematócrito na fase de avaliação da virulência dos isolados de *A.*

marginale como quadros de salmonelose septisêmica e intoxicação hídrica e durante a fase desafio quadros de babesiose e coccidiose. Todos os animais com esses quadros clínicos receberam tratamento específico para evitar maiores interferências no valor de volume globular. Assim, é necessário ressaltar a importância de se realizar no campo o diagnóstico diferencial dessas causas citadas e outras possíveis, pois caso contrário os resultados da vacinação com os inóculos de *A. marginale* podem ser subestimados e sua eficiência questionada por efeito de alguma outra causa.

Quanto ao volume globular dos animais *n*PCR negativos antes da primeira inoculação, não foram observadas alterações significativas nas médias de grupo para os animais inoculados no G2 e G3. Enquanto no G1 do dia 68 ao dia 80 foi observada queda significativa do volume em relação aos valores iniciais, porém se mantiveram dentro dos limites fisiológicos (Figura 15). Provavelmente este resultado ocorreu em decorrência da elevação da riquetsemia do grupo observada nesses dias da avaliação.

Do dia 56 ao dia 76 do experimento, os animais do grupo controle (G4) apresentaram valores de volume globular significativamente superiores aos observados nos animais inoculados. Aqui também as inoculações determinaram que o comportamento do volume globular fosse diferente entre os animais controles e vacinados (Figura 15). Como já discutido o aumento de volume globular observado apenas no grupo controle a partir do dia 56 acontece fisiologicamente.

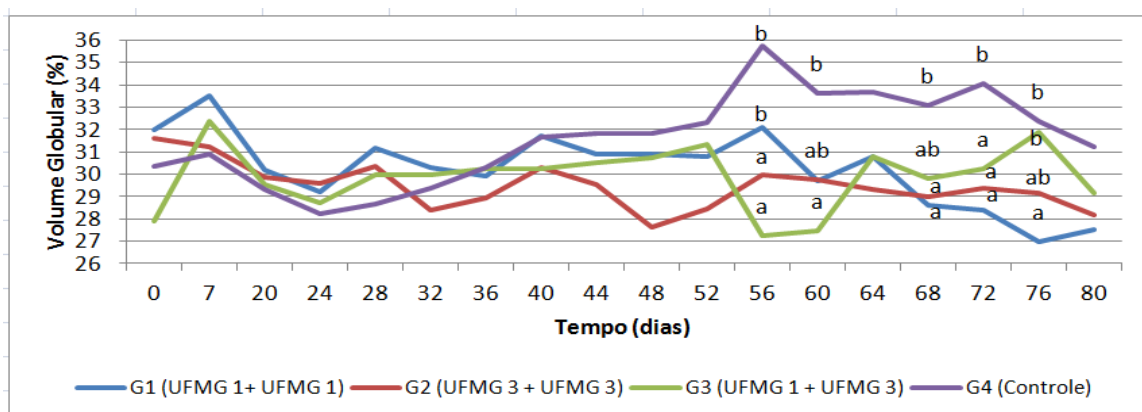


Figura 15: Dinâmica do volume globular durante o tempo de avaliação dos efeitos pós-vacinais (0 a 80 dias do experimento). Os valores representam as médias de volume globular em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de *A. marginale* (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G3: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental). Médias com letras diferentes representam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os grupos. Nessa análise foram considerados apenas os animais *n*PCR negativos antes da primeira inoculação.

5.2. Resistência à virulência dos inóculos

Os protocolos vacinais utilizados levaram alguns animais à manifestação de quadros brandos da enfermidade, sendo necessária medicação conforme os limites estabelecidos para auxiliar a

recuperação clínica. Esses achados diferem das observações de Coelho (2007), Bastos et al. (2010) e Meneses (2013) que utilizaram os isolados UFMG 1 e 3 em condições de ambiente controlado, em um galpão experimental, porém não foi necessária nenhuma intervenção medicamentosa para que os animais resistissem ao efeitos das inoculações. Entretanto, nestes experimentos o valor de volume globular estabelecido como limite para intervenção terapêutica foi mais baixo, o que leva a acreditar que existiria uma taxa de recuperação espontânea entre os animais inoculados, o que não foi possível observar nesse trabalho. O estabelecimento de limites maiores (18% de volume globular) para o tratamento dos animais se fez em razão do caráter desafiador do ambiente no qual os animais estavam. Nestas condições de campo havia maior influência do clima sobre os animais, densidade populacional elevada e proximidade entre animais enfermos e sadios. Além disso, as bezerras pertenciam a um rebanho comercial e de alto valor, no qual a aplicação dos inóculos sob estas condições poderiam representar um risco de vida para os animais.

O ambiente de campo e o manejo intensivo no qual os animais foram mantidos constituiu outro fator que determinou a maior necessidade de tratamentos. Segundo Coelho (2007) a recuperação espontânea é dependente do bom funcionamento dos mecanismos fisiológicos para a compensação dos sinais clínicos, especialmente da acidose metabólica. No campo, a eficiência de compensação pode ser comprometida, pois nos sistemas de criação utilizados atualmente, os animais são submetidos a exercícios físicos constantes e os doentes permanecem no mesmo manejo dos demais, o que diminui as chances de sobrevivência.

Como podem ser observados na tabela 8 e na figura 9, os tratamentos foram necessários nos momentos dos picos de ricketsemia. No G1 acontecendo entre 44 e 78 dias após a primeira inoculação, no G2 entre 32 e 63 dias e no G3 entre 41 e 78 dias. E entre os animais tratados no G1, 50% estavam positivos na *n*PCR realizada antes de passarem para o ambiente de desafio e nos demais grupos (G2, G3 e G4) esse número foi de 80%. Isso demonstra que a infecção observada na *n*PCR não garante proteção mas aumenta as chances do animal apresentar resistência imunológica contra as estirpes de campo pois, dos animais que permaneceram negativos na *n*PCR após as duas inoculações todos necessitaram de tratamento no G1e G3 e 66,66% destes animais negativos no G2 e G4 necessitaram ser tratados.

A frequência de animais que necessitaram de tratamento antimicrobiano na fase aguda da infecção por *A. marginale* inoculado não diferiu significativamente entre os grupos que receberam os protocolos de imunização (G1, G2 e G3) e também entre G1, G3 e controle (G4). No entanto, G2 apresentou a maior frequência de animais tratados (47,4%) e significativamente maior que os não inoculados. Dessa forma, apesar da similaridade em níveis de virulência entre os dois isolados (UFMG 1 e UFMG 3), descrita por Meneses (2013), a amostra UFMG 3 utilizada no protocolo do G2 demonstrou ser mais virulenta e menos segura para utilização como vacina viva. Portanto, seu uso implica em maior necessidade de acompanhamento dos animais inoculados, a fim de evitar que as reações vacinais causem maiores comprometimentos. Em situações de ambiente experimental controlado, a estirpe UFMG 1 deu origem a sintomas discretos, porém não suficientes para requerer intervenção medicamentosa (Coelho, 2007; Bastos et al., 2010; Kenneil et al., 2013). Esses resultados corroboram com os dados desse trabalho, visto que os grupos 1 e 3 nos quais foi utilizada a estirpe UFMG 1 mostraram não aumentar a frequência de tratamentos em relação a animais não inoculados, sendo então mais seguro para os animais.

Tabela 8: Frequência de tratamentos realizados nas bezerras dos grupos experimentalmente inoculados com duas amostras de *A. marginale* (UFMG 1 e UFMG 3), momentos em que foram realizados os tratamentos com enrofloxacina a 7,5 mg/kg após a primeira inoculação (*Média e variação). Protocolos utilizados: Grupo 1(G1): UFMG 1 + UFMG 1, Grupo 2(G2): UFMG 3 + UFMG 3, Grupo 3(G2): UFMG 1 + UFMG 3, Grupo 4 (G4): controle experimental.

Grupo	Fase de inoculação		Fase de desafio natural	
	Frequência de tratamentos (%)	Tempo após a 1ª inoculação (dias)*	Frequência de tratamentos (%)	Tempo após a 1ª inoculação (dias)*
G1 (n=15)	26,6	62,5 (44 - 78)	13,3	156,5 (153 - 200)
G2 (n=19)	47,4	48,1 (32 - 63)	26,3	160,2 (138 - 187)
G3 (n=17)	29,4	53,2 (41 - 78)	35,3	147,0 (86 - 227)
G4 (n=17)	11,8	50,0 (32 - 68)	58,8	155,8 (109 - 187)

A figura 16A mostra a frequência das bezerras em cada grupo experimental que adoeceram por anaplasnose e atingiram os pontos de corte instituídos para tratamento durante avaliação da virulência dos inóculos (riquetsemia $\geq 5\%$ ou hematócrito $\leq 18\%$ com riquetsemia patente de *A. marginale*).

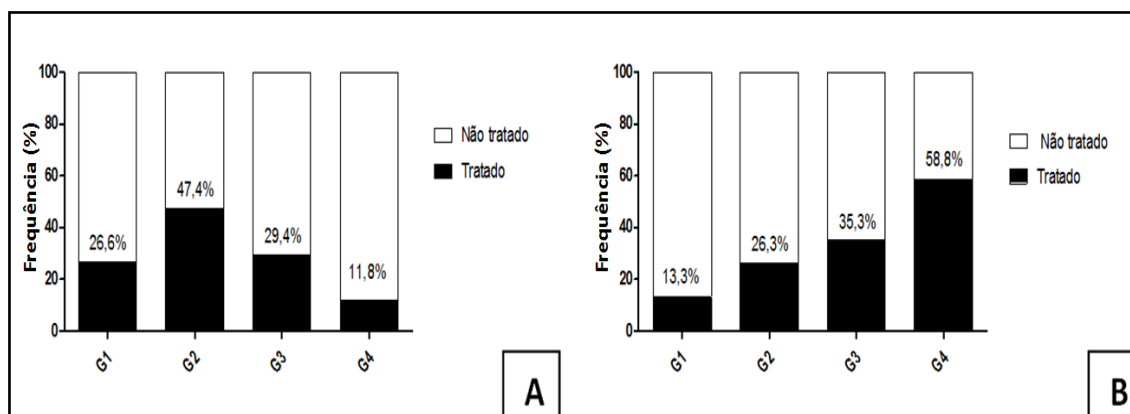


Figura 16: Frequência de tratamento antimicrobiano (enrofloxacina - 7,5 mg kg⁻¹) durante as inoculações (A) e na fase de desafio dos inóculos (B) em bezerras de um a 43 dias de vida, submetidas a 4 protocolos distintos de inoculação de *A. marginale* (G1: Amostra UFMG 1 + UFMG 1; G2: Amostra UFMG 3 + UFMG 3; G2: Amostra UFMG 1 + UFMG 3; G4: controle experimental).

O fato de alguns animais do grupo controle (G4) apresentarem riquetsemia e anaplasnose demonstra que houve infecção natural nesse ambiente. Assim, parte dos tratamentos realizados nos grupos inoculados podem ser consequência de amostras provenientes da infecção natural e não apenas consequência do uso dos inóculos administrados para imunização. Porém, a metodologia desse trabalho não permitiu estabelecer exatamente a estirpe que determinou cada tratamento.

Os casos de anaplasnose tratados com enrofloxacina na dose de 7,5 mg/kg por via IM foram solucionados de modo eficiente, corroborando com os achados de Facury Filho et al. (2012).

Foi observada diminuição significativa nos níveis de riquetsemia no sangue coletado dois dias após a administração do medicamento.

Entre os inicialmente animais *nPCR* negativos, a frequência de animais que necessitaram de tratamento devido as inoculações foi de 20% no G1, 46,15% no G2 e 27,27% no G3. No grupo controle a frequência de animais tratados por infecção natural nesse período de avaliação (dia 0 ao dia 80 do experimento) foi de 7,69%. A análise de comparação dessas frequências observadas mostraram as mesmas diferenças observadas quando se analisou todos os animais independente do resultado na *nPCR*. Logo o G2 mostrou uma frequência de tratamentos significativamente maior que o grupo controle (G4), mas foi igual quando comparada a frequência dos demais grupos inoculados. Os protocolos utilizados em G1 e G3 também mostraram não aumentar a frequência de animais tratados em relação à infecção natural do grupo controle.

5.3. Frequência de infecção verificada na *nested PCR*

Das amostras de sangue total dos animais com idade entre um e 43 dias de vida que foram submetidos a análise molecular de *nPCR* para o gene *msp4* de *A. marginale*, 21 (30,88%) foram diagnosticadas positivas antes de qualquer inoculação. Esse dado foi superior ao encontrado por Meneses (2013) que diagnosticou que 10% dos animais recém-nascidos provenientes dessa propriedade foram positivos nesse teste, sugerindo a ocorrência de transmissão vertical. Possivelmente a maior proporção de animais positivos na *nPCR* encontrada nesse trabalho representa um somatório das bezerras que sofreram transmissão vertical e aquelas precocemente infectadas de forma natural até o momento da coleta sanguínea, visto que não foram examinados exclusivamente animais recém-nascidos e 43 dias ultrapassa o período de incubação médio de *A. marginale*.

Considerando apenas os animais negativos na primeira avaliação de *nPCR* para *msp4*, obteve-se os dados relacionados na tabela 9, para a avaliação da frequência de animais que se tornam infectados após cada inoculação.

Tabela 9: Frequência (%) de bezerras experimentalmente inoculadas na idade entre um e 43 dias de vida com duas amostras de *A. marginale* (UFMG 1 e UFMG 3) que se tornaram positivos na *nPCR* (*msp4*) após cada inoculação e do desafio natural, partindo apenas dos animais com resultado negativo na análise pré-inoculação (dia 0).

Grupo	Pré-inoculação (%)	40 dias após a 1ª inoculação (%)	40 dias após a 2ª inoculação (%)	Pós-desafio (%)
G1 (n=10)	0 ^{bA}	90 ^{aA}	90 ^{aA}	100 ^{aA}
G2 (n=13)	0 ^{cA}	61,54 ^{bAB}	84,62 ^{abA}	100 ^{aA}
G3 (n=11)	0 ^{cA}	63,64 ^{bAB}	90,9 ^{abA}	100 ^{aA}
G4 (n=13)	0 ^{cA}	30,77 ^{bB}	61,54 ^{bA}	100 ^{aA}

b= nas linhas, Frequência com pelo menos uma letra minúscula em comum são equivalentes.

A= nas colunas, Frequência com pelo menos uma letra maiúscula em comum são equivalentes.

No período de quarenta dias após a primeira dose de inóculo, nenhum dos protocolos vacinais utilizados foi capaz de tornar todos os animais positivos para *A. marginale*. Estes dados diferem

dos resultados encontrados por Araújo (2005) e descritos por Bacanelli et al. (2014), que utilizando a técnica de PCR convencional com alvo de amplificação o gene da proteína MSP5 conseguiram detectar 100% de infecção a partir do 16º dia após a inoculação experimental. Essa diferença pode ser justificada pela utilização de uma estirpe distinta à utilizada neste trabalho, na qual pode apresentar uma maior capacidade infectante; pelo alvo utilizado para o diagnóstico da PCR (MSP5) e pelo número amostral reduzido (n=6). Além disso, outro fator importante que deve ser considerado é a idade dos animais, pois Araújo (2005) utilizaram animais entre 11 a 12 meses de idade, e segundo Ristic (1968) animais mais velhos e sem contato prévio com o agente infeccioso são mais susceptíveis à infecção.

A amostra UFMG 1 administrada nas duas inoculações do G1 tornou positivos 90% dos animais após uma aplicação. O G3 que recebeu na primeira dose a mesma amostra de *A. marginale* UFMG 1 apresentou uma taxa de 63,64%, e o isolado UFMG 3, utilizado nos animais do G2, mostrou ser capaz de converter em positivos 61,54% dos animais após a primeira dose. No entanto, não foram observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os isolados UFMG 1 e 3 quanto a capacidade de infectar os bovinos.

Os animais do G4 foram mantidos no mesmo ambiente dos demais animais e não receberam nenhuma das estirpes de *A. marginale*. Porém, sofreram infecção natural no ambiente, a qual foi responsável pela taxa de infecção detectada em 30,77% dos animais até o momento correspondente a 40 dias da primeira inoculação dos demais grupos. A frequência de animais infectados naturalmente foi significativamente igual à observada nos animais infectados por inoculações nos G2 e G3.

A realização da segunda inoculação determinou o aumento na frequência de animais positivos nos G2 e G3 (Tabela 9) enquanto isso, o G1 manteve o mesmo percentual atingido com a primeira dose. No grupo controle, a infecção natural aconteceu na mesma intensidade dos primeiros 40 dias de monitoramento, sendo nesse momento observado o dobro da frequência encontrada aos 40 dias após a primeira inoculação (Tabela 9).

Embora notáveis, tais observações não apresentaram diferenças entre a aplicação de uma ou duas doses de inóculo vacinal, quanto a capacidade de tornar os animais positivos. Entretanto, após os 80 dias de monitoramento, as bezerras foram desafiadas pela exposição natural através do contato com carrapatos nos piquetes de recria. Após 4 meses no ambiente de desafio todas as bezerras avaliadas no experimento se tornaram infectadas por *A. marginale*. Essa frequência foi significativamente igual à observada após duas inoculações no G1, G2 e G3, porém, foi maior que a proporção vista após a primeira inoculação no G2 e G3. Dessa forma, se fosse realizada apenas uma dose vacinal, uma parcela relevante dos animais pertencentes aos grupos G2 e G3 seriam transferidos para o campo ainda suscetíveis à primoinfecção natural, o que torna interessante a utilização da dose dupla. De modo similar, uma quantidade considerável de animais do grupo controle (38,46%) foram para o campo ainda não infectados, o que possivelmente foi responsável pelo maior número de tratamentos neste grupo durante o desafio.

5.4. Detecção de anticorpos através da RIFI

A partir dos 47 animais negativos na *nPCR* (*msp4*) realizada no dia 0, verificou-se que 72,3% dos animais (34/47) apresentavam anticorpos provenientes da imunidade passiva, pois descartou-se o número de animais que produziram anticorpos anti-*A. marginale* durante a vida fetal devida a infecção congênita, e os animais que sofreram infecção no ambiente antes das inoculações. Como as inoculações foram realizadas em bovinos muito jovens e com marcante presença de anticorpos colostrais no momento da primeira inoculação, não foram observadas diferenças significativas na frequência de animais positivos entre os grupos e tempos avaliados (Figura 17). Desse modo, não foi possível notar a redução dos anticorpos colostrais circulantes que era esperada segundo Ribeiro entre 12 e 40 dias de vida (Ribeiro, 1981). Os animais do grupo controle apesar de não inoculados, foram diagnosticados com infecção natural na *nPCR* na frequência de 30,77% (dia 40) e 61,54% (dia 80), o que justifica a manutenção dos níveis de imunoglobulina anti-*A. marginale* no período de avaliação das inoculações.

Os anticorpos passivos aparentemente não impediram os animais de se infectarem pelas inoculações, pois entre os animais que tinham anticorpos de origem materna (aqueles com resultados negativo na *nPCR* e positivo na RIFI antes das inoculações), apenas 30,8% (8/26) continuaram sem infecção após uma inoculação e 15,4% após duas inoculações. Esses dados corroboram com Gale et al. (1992) que relatam que bezerros com anticorpos contra *A. marginale* derivados de colostro não apresentaram aumento da resistência à infecção em relação ao verificado em animais soronegativos.

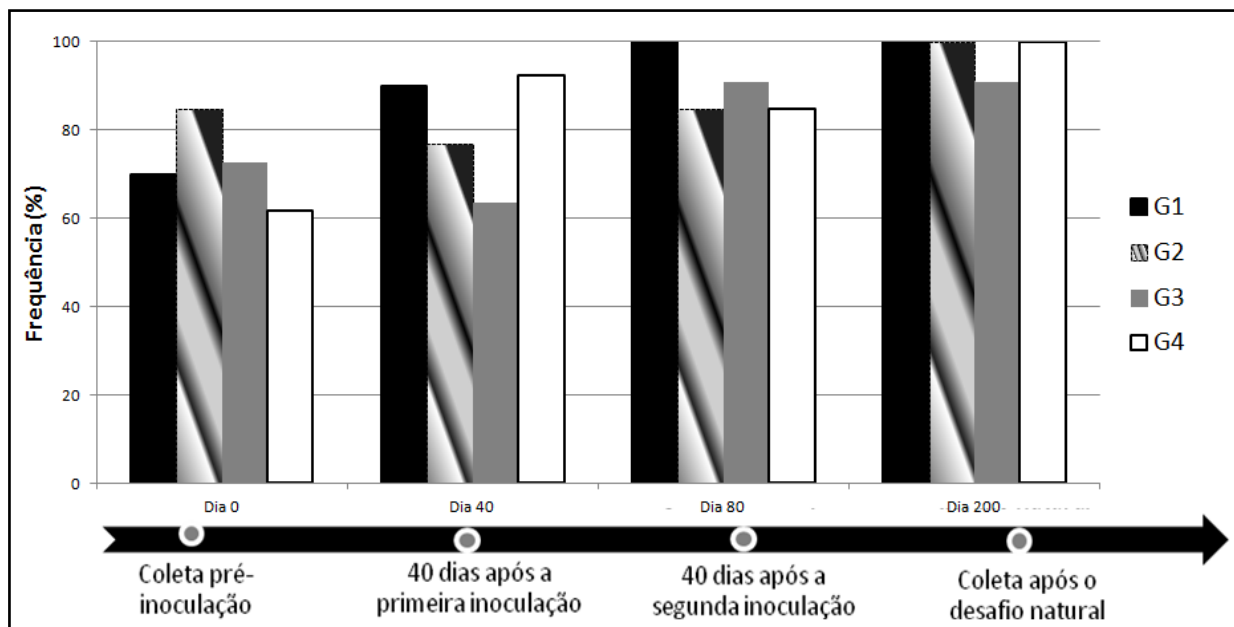


Figura 17: Frequência (%) de bezerras experimentalmente inoculadas na idade entre um e 43 dias de vida com duas amostras de *A. marginale* (UFMG 1 e UFMG 3) positivos na RIFI (título de 1:40) na análise pré-inoculação, 40 dias após a primeira inoculação, 40 dias após a segunda inoculação e após o desafio natural.

5.5. Resistência ao desafio natural

A capacidade de proteção imunológica induzida pelos inóculos contra a infecção natural por vetores no campo foi analisada pela comparação das frequências de animais que necessitaram de tratamento na fase de desafio (figura 16B). Em todos os grupos vacinados e no grupo controle foi necessário tratar animais com droga específica para controlar a ricketsemia. O G4, que não recebeu nenhum imunógeno apresentou a maior frequência de medicações com 58,85% dos animais acometidos pela doença. Dessa forma, apesar de apresentarem anticorpos diagnosticados através da RIFI, quando foram expostos ao desafio, tal resposta não significou proteção efetiva.

A imunidade contra anaplasnose não é relacionada apenas a resposta humoral, visto que a administração de soro com altos títulos de anticorpos em animais susceptíveis não foi capaz de proteger animais contra o desafio com *A. marginale* (Gale et al., 1992). Além disso, Lasmar et al. (2012) conseguiram a soroconversão em bezerros imunizados com uma vacina morta produzida a partir de *A. marginale* cultivado em células IDE8, mas essa resposta não foi suficiente para prevenir a anaplasnose induzida nas condições do experimento. A imunidade celular certamente é importante e relaciona-se com a ação de linfócitos Th tipo 1, associada com a produção de interferon gama (IFN γ), interleucina (IL2 e IL12), que são capazes de reduzir a manifestação clínica da doença (Brown et al., 1998; de la fuente et al., 2002).

Os tratamentos ocorreram em momentos variados durante o desafio. No G1 aconteceram entre 153 e 200 dias de avaliação, no G2 entre 138 e 187 dias, no G3 entre 86 e 227 dias e no G4 (controle) entre 109 e 187 dias. (Tabela 8). Os grupos G1 e G2 que receberam respectivamente, duas doses da amostra UFMG1 e duas doses de UFMG3, apresentaram uma frequência de tratamentos significativamente menor que o grupo controle. Dessa forma, foi demonstrada a proteção parcial de 86,7% e 73,7% dos animais do G1 e G2 respectivamente. Vizcaino et al. (1980) avaliando a imunização de bovinos com um isolado de baixa virulência da Colômbia, obtiveram um nível de proteção de 100% dos animais imunizados não manifestaram anaplasnose sob desafio a campo, enquanto 93% dos animais não vacinados tiveram sinais clínicos e 17% vieram a óbito. Contudo, apesar da amostra UFMG 3 ter sido isolada de um bezerro com infecção congênita proveniente da mesma propriedade (Meneses, 2013) e a estirpe UFMG 1 conferir proteção contra a amostra altamente virulenta (UFMG 2) que foi isolada de um animal desse rebanho (Bastos et al., 2010), é possível que a ocorrência de animais que não foram protegidos seja justificada pela infecções de várias estirpes de campo que apresentem maiores diferenças antigênicas em relação as amostras utilizadas como imunógenos nesse trabalho, uma vez que a diversidade genética de *A. marginale* é consideravelmente alta, mesmo dentro de um único rebanho (Pohl, et al. 2013).

Curiosamente, verificou-se que não houve um nível proteção significativa no G3 (UFMG1+UFMG3), pois a frequência de animais tratados nesse grupo foi estatisticamente igual a verificada no grupo controle demonstrando que o uso de tal protocolo não foi capaz de induzir proteção suficiente contra o desafio natural. O G1 e o G2 apresentaram níveis de proteção semelhantes estatisticamente, porém no G1, a porcentagem de falha vacinal foi de 13,3% enquanto G2 apresentou 26,3%. Dessa forma, apesar de não significativo em termos estatísticos

pode ser mais vantajoso utilizar o protocolo UFMG1 + UFMG1 frente ao protocolo UFMG3 + UFMG3.

Na etapa de desafio os animais inicialmente *n*PCR negativos que precisaram ser tratados no G1 correspondem a 20% do grupo, no G2 23,07%, no G3 36,36% e no grupo controle (G4) 69,23%. As diferenças observadas entre essas frequências foram as mesmas que na análise de todos os animais avaliados. Sendo observado que no G1 e G2 os animais necessitaram significativamente de menos tratamentos que o grupo controle. Dessa forma, houve proteção de 80% nos animais do G1 e 76,92% no G2 enquanto o protocolo utilizado no G3 não alcançou nível de proteção suficiente para que os animais resissem ao desafio natural aqui utilizado.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inoculação de bezerros neonatos com amostras de *A. marginale* de baixa virulência se mostrou eficiente no controle da anaplasmose no rebanho estudado.

O momento escolhido para imunizar os animais jovens foi favorável, pois a presença de anticorpos colostrais em 72,3% dos animais não impediu o estabelecimento da infecção ativa devido às inoculações. A imunidade passiva juntamente com a intensa atividade eritropoietica dos bezerros nessa faixa etária possivelmente constituíram fatores de resistência natural dos animais aos efeitos da virulência dos inóculos.

A utilização dos inóculos de *A. marginale* em duas aplicações subcutâneas com dose infectante mínima foi eficiente e apresentou baixa virulência apesar das condições ambientais de campo desse trabalho serem mais desafiantes à saúde dos animais comparado às condições de outros experimentos

Nas condições desse experimento, o inóculo de *A. marginale* UFMG 1 administrado em duas aplicações subcutâneas apresentou baixa virulência e apenas 26,6% dos animais inoculados com duas doses apresentaram quadros brandos de anaplasmose e necessitaram ser tratados conforme a metodologia do trabalho.

Não foi possível observar nesse trabalho a recuperação espontânea das manifestações clínicas causadas pelos inóculos, pois o valor de volume globular estabelecido como limite para intervenção terapêutica foi mais alto, em razão das condições ambientais e de manejo que configuravam um fator complicador de desafio para a saúde dos animais.

Os tratamentos com enrofloxacin na dose de 7,5 mg/kg se mostraram eficientes e foram necessários em momentos variáveis durante o período avaliado. No G1(UFMG 1 + UFMG 1) aconteceram entre 44 e 78 dias após a inoculação, no G2 (UFMG 3 + UFMG 3) entre 32 e 63 dias e no G3 (UFMG 1 + UFMG 3) entre 41 e 78 dias.

Após as inoculações 90%, 84,62% e 90,9% dos animais se tornaram positivos na *n*PCR pela inoculação dos protocolos utilizados no G1, G2 e G3 respectivamente. Porém, o diagnóstico de riquetsemia no esfregaço sanguíneo foi observado em uma frequência menor de 73,33%, 73,68% e 76,47% dos animais pertencentes respectivamente ao G1, G2 e G3.

As inoculações desencadearam uma resposta imune que foi observada através da manutenção da frequência de animais positivos na RIFI inicialmente a custa de imunidade passiva, até o final das avaliações pela presença de anticorpos produzidos devido às inoculações.

Quando os animais foram expostos no campo ao desafio pela infecção transmitida por carrapatos e moscas hematófagas foi observado que no G1, 86,7% e no G2, 73,7% dos animais foram protegidos contra o desafio e não necessitaram de tratamento. Apesar dos protocolos utilizados no G1 e G2 apresentarem níveis de proteção semelhantes, o G1 determinou efeitos mais brandos durante as inoculações sendo então o protocolo mais indicado por ser mais seguro para a saúde dos animais e também o mais efetivo na proteção contra o desafio natural nas condições deste experimento.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A utilização de duas doses de inóculo de *A. marginale* em bezerros neonatos garantiu o estabelecimento de infecção na maior parte dos animais inoculados (entre 84,62% a 90,9%);
- ✓ A utilização de inóculos de *A. marginale* de baixa virulência em bezerros neonatos resultou baixas riquetsemias, com pequenas alterações de volume globular e determinou a ocorrência de poucos casos clínicos e uma pequena proporção de animais necessitou tratamento específico;
- ✓ O uso dos protocolos de inoculação determinaram frequências relativamente baixas de animais que necessitaram ser tratados e o protocolo UFMG 1 + UFMG 1 foi o que apresentou menor número de animais tratados devido aos efeitos das inoculações de *A. marginale*, sendo portanto o protocolo mais seguro para os animais;
- ✓ Ocorreu proteção parcial conferida pelo uso de duas inoculações de UFMG 1 ou UFMG 3 contra o desafio da infecção natural no campo.

8. REFERÊNCIAS

ALMAZAN, C.; MEDRANO, C.; ORTIZ, M. et al. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic area. *Vet. Parasitol.*, v.158, p.103–109, 2008.

ANDRADE, G. M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. et al. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in dairy cattle and studies on the dynamics of natural infection of Holstein calves in Southern Brazil. *Semina: Ci. Agrárias*, v.22, p.155-159, 2001.

ARAÚJO, F. R. *Avaliação das proteínas recombinantes MSP1a e MSP2 de Anaplasma marginale, associada a oligonucleotídeo CpG 2006 como adjuvante, como imunógenos contra a anaplasmoze bovina*. 2005. 171f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O. et al. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Bras.*, v.23, p.139-148, 2003.

AUBRY, P.; GEALE, D. W. A review of bovine anaplasmosis. *Transb. Emerg. Dis.*, v.58, p.1-30, 2011.

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. *Pesq. Vet. Bras.* v.34, n.1, p.29-33, 2014.

BARROS, S. L.; MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R. et al. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigenima*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.100, p.513-517, 2005.

BASTOS, C. V.; PASSOS, L. M. F.; FACURY FILHO, E. J. et al. Protection in the absence of exclusion between two Brazilian isolates of *Anaplasma marginale* in experimentally infected calves. *Vet. J.*, v.186, p.374-378, 2010.

BRIZUELA, C. M. C. A.; ORTELLADO, A.; SANABRIA, A. et al. The safety and efficacy of Australian tick-borne disease vaccine strains in cattle in Paraguay. *Vet. Parasitol.*, v.76, p.27–41, 1998.

BROCK, V. W.; KLIEWER, I. O.; PEARSON, C. C. A vaccine for anaplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v.147, p.948-951, 1965.

BROWN, W. C.; SHKAP, V.; ZHU, D. et al. CD4+ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect. Immun.* v.66, n.11, p.5406-5413. 1998.

BROWN, W. C.; PALMER, G. H.; LEWIN, H. A. et al. CD4+ T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex

of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. *Infect. Immun.*, v.69, p.6853-6862, 2001.

BROWN, W. C. Adaptative immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: implications for bacterial persistence. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.35, p.241-252, 2012.

BRUN-HANSEN, H. C.; KAMPEN, A. H.; LUND, A. Hematologic values in calves during the first 6 months of life. *Veterinary Clinical Pathology*, v.35, n.2, p.182-187, 2006.

CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, E. et al. First report of bovine anaplasmosis caused by *Anaplasma centrale* in Europe. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* v.1149, p107–110, 2008.

CARSON, C. A.; SELLS, D. M.; RISTIC, M. Cell mediated immune response to virulent and attenuated *Anaplasma marginale* administered to cattle in live and inactivated forms. *Am. J. Vet. Res.*, v.38, p.173-179, 1977.

CAXITO, L. M. *Influência etária e nutricional na hematologia de bezerros da raça holandesa*. 2013. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais

COELHO, L.C.T. *Anaplasmosse bovina: parâmetros clínicos e de patologia clínica em bezerros infectados experimentalmente*. 2007. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CORONADO, A. Is *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*? Technical note. *Revista Científica FCV-LUZ*, v.11 n.5, p.408-411, 2001.

CORRIER, D. E.; VIZCAINO, O.; CARSON, C. A. et al. Comparison of Three methods of imunization aganist bovine anaplasmosis: An examination of postvaccinal effects. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, n.7, p.1062-1065, 1980.

DARK, M.J.; AL-KHEDERY, B.; BARBET, A.F. Multistrain genome analysis identifies candidate vaccine antigens of *Anaplasma marginale*. *Vaccine*, v.29, p.4923-4932, 2011.

DE LA FUENTE, J., KOCAN, K.M., GARCIA-GARCIA, J.C., et al. Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks. *Vet. Microbiol.*, v.89, n.2-3, p.239-251, 2002.

DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Infection exclusion of rickettsial pathogen, *Anaplasma marginale*, in tick vector, *Dermacentor variabilis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* v.10, p. 182–184. 2003.

DE LA FUENTE, J.; RUIZ-FONS F.; NARANJO, V. et al. Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Res. Vet. Sci.*, v.84, p.382-386, 2008.

DENNIS, R.A.; O'HARA, P.J.; YOUNG, M.F. et al. Neonatal immunohemolytic anemia and icterus of calves. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v.156, p.1861-1869, 1970.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.D.; STÖBER, M.. *Rosenberger: Exame Clínico dos Bovinos*. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1993, 419p.

DUMLER, J. S. A. F.; BARBET, C. P. J.; BEKKER, G. A.; et al. Reorganization of the 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*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v.51, p.2145–2165, 2001.

ERIKS, I.S.; STILLER, D.; PALMER, G.H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, p. 2091-2096, 1993.

EWING S.A. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: Proceedings of the 7th National Anaplasmosis Conference, 1981, Mississippi State University, Mississippi State. Mississippi State University, p.395-423, 1981

FACURY-FILHO E. J.; CARVALHO A. U.; FERREIRA P. M.; et al. Effectiveness of enrofloxacin for the treatment of experimentally-induced bovine anaplasmosis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v.21, n.1, p.32-36, 2012.

FEITOSA, F.L.F. 2ª ed. *Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico*. São Paulo: Roca, 2008. 754p.

FIGUEROA J. V.; ALVAREZ J. A.; RAMOS, J. A.; et al. Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases. In: Tropical Veterinary Medicine: Molecular Epidemiology, Hemoparasites and Their Vectors, and General Topics 1998. *Annals of the New York Academy of Sciences* v.849, p.1-10. 1998.

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

GALE, K. R.; LEATCH, G.; GARTSIDE, M. et al. *Anaplasma marginale*: failure of sera from immune cattle to confer protection in passive-transfer experiments. *Parasitol. Res.*, v.78, p.410-415, 1992.

GONÇALVES RUIZ, P. M.; PASSOS, L.M.F.; MARTINS, M.S. et al. Antigenic characterization of morphologically distinct *Anaplasma marginale* isolates using a panel of monoclonal antibodies. *Vet. Parasitol.*, v.107, p.169–177, 2002.

GONÇALVES, R. C.; SILVA, A. A.; FERREIRA, D. O. L. et al. Tristeza parasitária em bovinos na região de Botucatu – SP: estudo retrospectivo de 1986-2007. *Semina: Ci. Agrárias*, v.32, n.1, p.307-312, 2011.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, G. E. M. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, v.21, p.8-10, 2002.

GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.*, v. 57, p. 109-119, 1995.

GUGLIELMONE, A. A.; V. R. VANZINI. Análisis de fracasos en la prevención de la anaplasmosis y la babesiosis en bovinos inoculados con vacunas vivas. *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires)*, v.80, p.66-68, 1999.

HAMMAC, G. K.; KU, P.; GALLETI, M.F. et al. Protective immunity induced by immunization with a live, cultured *Anaplasma marginale* strain. *Vaccine*, v.31 p.3617- 3622, 2013.

IICA – Instituto Interamericano de Cooperación para a Agricultura: *Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina*, San José, Costa Rica, 1987.

JAIN, N. C. Schalm's Veterinary Hematology. Philadelphia, Ed. Lea & Febiger, c.7. p.178-207, 1986.

JONSSON, N. N., BOCK, R.E., JORGENSEN, W. K.; et al. Is endemic stability of tick-borne disease in cattle a useful concept?. *Trends in parasitology*, v.28, n.3, p.85-89, 2012.

KENNEIL, R.; SHKAP, V.; LEIBOVICH, B. et al. Cross-protection between geographically distinct *Anaplasma marginale* isolates appears to be constrained by limited antibody responses. *Transbound. Emerg. Dis.* v.60, n.2, p.97-104, 2013.

KESSLER, R. E.; SASTRE, A. M.; MOREIRA, M. A. et al. Experiencias con vacunas vivas atenuadas de *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Anaplasma marginale* y *A. centrale* conservadas por congelación en Brasil. *Rvta. Cub. Cienc. Vet.* v.22 n.3, p.189-196, 1991.

KOCAN, K.M.; EWING, S. A.; HAIR, J. A., et al. Demonstration of the inclusion appendage of *Anaplasma marginale* in nymphal *Dermacentor andersoni*. *Am Vet Res.*, v.45. p1800-1807, 1984.

KOCAN, K.M.; BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F. Anaplasmosis control: past, present and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.916, p.501-509, 2000.

KOCAN, K.M., HALBUR, T., BLOUIN, E.F. et al. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Vet. Parasitol.*, v. 102, p.151-161, 2001.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A. et al. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.16, n.4, p.698-712, 2003.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E.F. et al. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales : Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*, v129: p.285-300, 2004.

KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, F.J.; BLOUIN, E. F. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.*, v. 167. p. 95-107, 2010.

KREIER, J. P.; RISTIC, M. Anaplasmosis. XI. Immunoserologic characteristics of the parasites present in the blood of calves infected with the Oregon strains of *Anaplasma marginale*, *Am. J. Vet. Res.* v.24, p.688-696, 1963.

KUTTLER, K. L. A study of the immunological relationship of *Anaplasma marginale* e *Anaplasma centrale*. *Res. In Vet. Sci.*, v.8, p.467-471, 1967.

KUTTLER, K. L.; ZARAZA, H. Premunization with an attenuated *Anaplasma marginale*. *Proc. U. S. Anim. Health Assoc.*, v.73, p.104-112, 1969.

KUTTLER, K.L.; WINNARD, L. D. Serological comparisons of four anaplasma isolates as measured by the complement-fixation test. *Vet. Microbiol.* v.9, p.181-186, 1984.

KUTTLER, K. L.; ZAUGG, J.L. Characteristics of an attenuated *Anaplasma marginale* of deer origin as an anaplasmosis vaccine. *Trop Anim Health Prod.*, v.20 p.85-91, 1988.

LASMAR, P. V. F.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J. et al. Evaluating the effectiveness of an inactivated vaccine from *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.21, p.112-117, 2012.

LEVERICH, C. K.; PALMER, G. H.; KNOWLES JR, D. P. et al. Tick-Borne Transmission of Two Genetically Distinct *Anaplasma marginale* Strains following Superinfection of the Mammalian Reservoir Host. *Infect. Immun.*, v. 76, n.9, p. 4066-4070, 2008

MADRUGA, C. R.; KESSLER, R. H.; GOMES, A., et al. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.20, p.135-142, 1985.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.*, v.48, p.292-298, 1972.

MARANA, E. R. M.; DIAS, J. A.; FREIRE, R. L. 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. *Res. Bras. Parasitol. Vet.*, v.18, p.20-26, 2009.

MELÉNDEZ, R. D.; TORO BENÍTEZ, M.; NICCITA, G. et al. Humoral immune response and hematologic evaluation of pregnant Jersey cows after vaccination with *Anaplasma centrale*. *Vet. Microbiol.*, v.94, p.335-339, 2003.

MELO, V. S.; PASSOS, L. M. F.; FACURY FILHO, E. J. et al. Natural infection of calves by *Anaplasma marginale* in dairy herds of the Metalúrgica Region, Minas Gerais. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.21, n.4, p.146-150, 2001.

MENESES, R. M. *Isolamento e caracterização molecular de Anaplasma marginale de origem congênita e avaliação da virulência em bezerros experimentalmente infectados*. 2013. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, A. A.; DE PEDREIRA, P. A. S.; ALMEIDA, M. F. R. Doenças de bezerro. II Epidemiologia da anaplasmosose no estado de Sergipe. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.44, p.377-386, 1992.

PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; CANTOR, G.H. et al. Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. *Infect. Immun.*, v.57, p.3666- 3669, 1989.

PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F. R.; KOCAN, K.M. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol. Today*, v.15, p.281–286, 1999.

PALMER, G.H. 1989. *Anaplasma* vaccines. In Veterinary protozoan and hemoparasites vaccines. I.S. Wright, Ed.: 1–29. CRC Press, Boca Raton, Florida.

PASSOS, L. M. F.; LIMA, J. D. Diagnóstico de anaplasmosose bovina congênita em Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.36, p.743-744, 1984.

PAYNE, R. C.; OSORIO, O.; YBAÑEZ, A. Tick-borne disease of cattle in Paraguay. II. Immunization against anaplasmosis and babesiosis. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v.22, p.101-108, 1990.

POHL, A. E.; CABEZAS-CRUZ, A.; RIBEIRO, M. F. B. et al. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.22(1), p.129-135, 2013.

PYPERS, A. R.; HOLM, D. E.; WILLIAMS, J.H. Fatal congenital anaplasmosis associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in a crossbred calf. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v.82, p.179-182, 2011.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F.C. et al. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2. ed. Singapura: Wiley-Blackwell Ltd, 2011. 912p.

RIBEIRO, M. F. B.; REIS, R.; SALCEDO, J. H. P. Avaliação de vacina atenuada de *Anaplasma marginale* em bezerros mantidos em piquetes. *Arq. Esc. Vet. UFMG.*, v.32, n.2, p.251-258, 1980.

- RIBEIRO, M. F. B. Exposição natural de bezerros em áreas endêmicas de *Anaplasma marginale* de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v.33, p.63-66, 1981.
- RIBEIRO, M. F. B.; REIS, R. Prevalência de anaplasmose em quatro regiões do estado de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v.33, p.57-62, 1981.
- RIBEIRO, M. F. B.; PATARROYO, J. H. S.; SANTOS, J. L. et al., Inquerito de Opinião Com Criadores da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. I. Alguns Fatores Associados Com A Mortalidade de Bezerros. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.35, n.4, p.547-556, 1983.
- RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D.; GUIMARÃES, A. M. et al. Transmissão congênita da anaplasmose bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.47, p.297-304, 1995.
- RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.*, v. 61, n. 1-2, p.31-39, 1996.
- RIBEIRO M. F. B.; LIMA J.D; SALCEDO J.H.P. Attempted transmission of *Anaplasma marginale* by infected *Boophilus microplus*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 48, p. 397-402, 1996.
- RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS, L. M. F.; GUIMARÃES, A. M.. Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais, Brazil. *Vet. parasitol.*, v. 70, p. 271-277, 1997.
- RIBEIRO, M. F. B.; PASSOS L. M. F. Tristeza Parasitária Bovina. *Cad. Tec. Vet. Zootec.* v. 39, p. 36-52, 2002.
- RIBEIRO, M. F. B.; FACURY FILHO, E. J.; PASSOS, L. M. F. et al. Uso de inóculo padronizado de *Anaplasma marginale* e da quimioprofilaxia no controle da anaplasmose bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, p.21-26, 2003.
- RISTIC, M.; SIBINOVIC, S.; WELTER, J. C. An attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. *Proc. 72nd Ann. Meet. U. S. Livest. Sanit. Assoc.*, v.72, p.56-69, 1968.
- RODRÍGUEZ, S. D.; GARCÍA ORTIZ, M. A.; HERNÁNDEZ SALGADO, G. et al. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, v.23, p.239-252, 2000.
- ROGERS, R. J.; DIMMOCK, C.K.; DE VOS, A. J. et al. Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced *in vitro* against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Aust. Vet. J.*, v.65, p.285-287, 1988.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3 ed. Belo Horizonte: FEPMVZ. 264p., 2010.

SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. *Veterinary Hematology*. LEA e Febiger, Philadelphia. 807p., 1975.

SCOLES, G.A.; BROCE, A. B.; LYSYK, T.J. Relative Efficiency of Biological Transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) Compared with Mechanical Transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *J. Med. Entomol.*, v.42, n.4, p.668-675, 2005.

SHKAP, V.; PIPANO, E.; MCGUIRE, T. C., et al. Identification of immunodominant polypeptides common between *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.29, p.31-40, 1991.

SILVA, J. B.; FONSECA, A. H. Analysis of the risk factors related to the immune humoral anti-*Anaplasma marginale* in dairy cattle. *Semina: Ci Agrárias*, v.34, n.2, p.777-784, 2013.

SILVA, J. B.; FONSECA, A.H. Risk factors for anaplasmosis in dairy cows during the peripartum. *Trop. Anim. Health. Prod.*, v.46, p.461-465, 2014.

SILVEIRA, J. A. G. *Ocorrência de hemoparasitos e ectoparasitos em veado-catingueiro (Mazama gouazoubira Fischer, 1814), veado-campeiro (Ozotocerus bezoarticus Linnaeus, 1758) e cervo-do-pantanal (Blastocerus dichotomus Illiger, 1815): utilização de métodos parasitológicos e moleculares*. 2012. 133f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVEIRA, J. A. G.; RABELO, E. M. L.; RIBEIRO, M. F. B. Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). *Transbound. Emerg. Dis.*, v.59, p.353-360, 2012.

SILVESTRE, B. T.; RABELO, E. M. L.; VERSIANI, A. F. et al; Evaluation of humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized with a recombinant fragment of MSP1a from *Anaplasma marginale* using carbon nanotubes as a carrier molecule. *Vaccine*. v.32, p.2160–2166, 2014.

SOUZA, F. A. L.; BRAGA, J. F. V.; PIRES, L. V. et al. Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in northeastern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* v.33, n.9, p.1057-1061, 2013.

SOUZA, J. C. P.; SOARES, C.O.; MASSARD, C.L. et al. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. *Pesq. Vet. Bras.*, v.20, p.97-101, 2000.

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

STICH R.W.; KOCAN, K. M.; PALMER GH, et al. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. *Am. J. Vet. Res.*, v.50, n.8, p.1377-1380, 1989.

THEILER, A. *Anaplasma marginale*: The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. In: THEILER, A. *Report of the Government Veterinary Bacteriologist 1908 – 1909*. Transvaal, South Africa: Transvaal Department of Agriculture, 1910. p. 6–64.

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

TODOROVIC, E.; GONÇALEZ, E.; LOPES, G. Immunization against anaplasmosis and babesiosis. Part II. Evaluation of cryopreserved vaccines using different doses and routes of inoculation. *Tropenmed. Parasit.* v.29, p.210-214, 1978.

TRINDADE, H. I.; ALMEIDA, K. S.; SOUSA, M.G. et al. Frequência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região de Araguaína, Estado do Tocantins, Brasil. *Ciência Animal*. v.21, n.2, p.119-125, 2011.

VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; MACHADO, R. Z. et al. Avaliação do desempenho de uma vacina constituída por *Anaplasma centrale* e cepas atenuadas de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* contra a tristeza parasitária bovina. *Semina: Ci. Agr.*, v.19, n.1, p.26-30, 1998.

VILAS NOVAS, J. C.; VIANA, F. C. Avaliação a campo da vacina atenuada de *Anaplasma marginale* na imunização de bezerras. *Arq. Esc. Vet. UFMG.*, v.32, n.1, p.57-62, 1980.

VIZCAINO, O.; CORRIER, D.E.; TERRY, M.K. et al. Comparison of Three methods of imunization against bovine anaplasmosis: Evaluation of protection afforded against field challenge exposure. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, n.7, p.1066-1068, 1980.

WANDURAGALA, L.; RISTIC, M. Anaplasmosis. In: WOLDEHIWET, Z.; RISTIC, M. *Rickettsial and chlamydial disease of Domestic animals*. England: Pergamon Press Ltda, 1993. c.3, p.65-87.

WANER, T.; MAHAN, S.; KELLY, P.; et al. Rickettsiales. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J. G. et al. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4.ed. Wiley-blackwell., 2010. c.31, p.589-621.

WILSON, A. J.; PARKER, R.; TRUEMAN, K. F. Experimental immunization of calves against *Anaplasma marginale* infection: observations on the use of living *A. Centrale* and *A. marginale*. *Vet. Parasitol.*, v.7, p. 305-311, 1980.

YOSHIHARA, E.; VIDOTTO, O.; YAMAMURA, M.H. et al. Studies of natural infection with *Anaplasma marginale* in Nelore cattle in the Umuarama municipality, Paraná state, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Vet.*, v.12, p.21-26, 2003.

ZARAZA, H.; KUTTLER, K. L. Comparative efficacy of diferent imunization systems against anaplasmosis. *Trop. Anim. Helth Prod.*, v.3, p.77-82, 1971.