

Andréa Caetano Silva Lbs



**AVALIAÇÃO DO CURSO DA INFECÇÃO
E DA RESPOSTA HUMORAL PARA
Anaplasma marginale (THEILER,
1910) EM BOVINOS SUBMETIDOS AO
PROCESSO DE PREMUNIÇÃO.**

Tese apresentada à Escola de
Veterinária da UFMG, como
requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre em Medicina
Veterinária.

U. F. M. G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



000057239202 0000

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

103/04

Belo Horizonte

1991

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
04/05/92
572392-02

T636.089 69

L881a Löss, Andréa Caetano Silva, 1961 -

Avaliação do curso da infecção e da resposta humoral para *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) em bovinos submetidos ao processo de premunição / Andréa Caetano Silva Löss. - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1991.

67p. : il. -

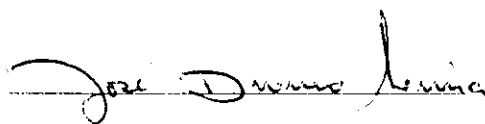
Dissertação (Mestrado)

1 - Anaplasmosose - Aspectos imunológicos - Teses

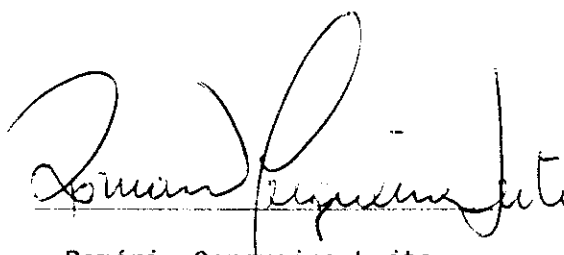
2 - Bovino - Doenças - Aspectos imunológicos -

Teses. I. Título.

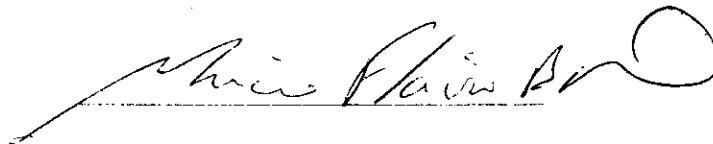
Aprovada em 13/12/91



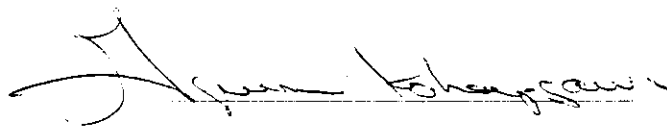
José Divino Lima



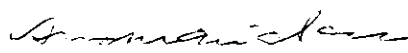
Romário Cerqueira Leite



Múcio Flávio Barbosa Ribeiro



Aguemi Kohayagawa



Ana Maria Sastre Sacco



Ao José Divino e ao meu pai.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Divino Lima, pela orientação, paciência, carinho e amizade.

Aos Prof^S. Romário Cerqueira Leite e Múcio Flávio Barbosa Ribeiro, pela orientação e sugestões.

Ao amigo Clóvis José Braz Jr., pelo enorme auxílio prestado no processamento do material.

A Dra. Teresinha Inês Assumpção, pelo auxílio na colheita de material, realização de exames e tratamento dos animais.

A Vianita Barcelos Corrêa, proprietária da Fazenda Mata Velha, pela cessão do local e animais para a realização deste trabalho.

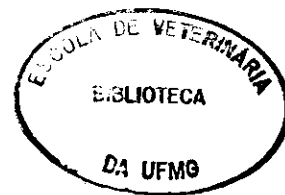
Aos amigos Antônio Carlos (Limão) e Pablo, pela paciência e ajuda na análise dos dados, confecção dos gráficos e tabelas e pelo empréstimo do microcomputador.

À minha mãe e ao Sérgio, pelo incentivo e carinho.

Aos colegas do Mestrado, pela amizade.

Aos amigos e funcionários do Setor de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pela amizade e colaboração.

A CAPES, pela bolsa de estudos.



RESUMO

Trinta e nove animais, de ambos os sexos, com idade aproximada de 24 meses, da raça Limousin, importados dos Estados Unidos, foram submetidos ao processo de premunicação, no município de Capitólio (MG). Os animais foram divididos em 5 grupos e foram inoculados com *Babesia* spp. através de sangue contendo 5×10^8 eritrócitos infectados, ou infestados com larvas de *Boophilus microplus* obtidas a partir de fêmeas ingurgitadas, provenientes de animais naturalmente infectados por *Babesia* spp. e receberam inoculação de 5×10^8 *Anaplasma marginale* simultaneamente ou 17 dias após a inoculação da *Babesia*. Esfregaços sanguíneos diários, determinação do volume globular semanal e da temperatura retal diariamente, no período da manhã e à tarde, foram realizados para a verificação do período prepatente, parasitemia e instituição dos tratamentos. Somente os dados para *A. marginale* foram considerados neste trabalho. O perfil sorológico dos animais, para *A. marginale*, foi observado através de exames semanais, pela reação de imunofluorescência indireta. Todos os animais foram desafiados em relação ao *A. marginale* 56 (grupos 3 e 5) e 73 (grupos 1, 2 e 4) dias após a inoculação. Para os

diferentes grupos, o período prepatente médio variou de 19,8 a 26 dias, a parasitemia média no início do tratamento foi de 2,3% e o número médio de tratamentos/animal foi de 3,2 a 4,4. O volume globular sofreu quedas após as fases de parasitemia de *A. marginale*, antes e após desafio. As temperaturas retais apresentaram elevações, maiores no período da tarde, na fase clínica da anaplasnose. A sorologia, títulos máximos (1:5120) de anticorpos anti-*A. marginale* foram obtidos 49 DAI. Após o desafio os títulos foram crescentes até o 48^o dia.



SUMMARY

This study was undertaken to evaluate the course of infection by *Anaplasma marginale* and the immune response in cattle associated with preimmunization against anaplasmosis. Thirty-nine Limousin cattle, about twenty-four months old, of both sexes, imported from the United States to Capit6lio (MG) were used. Animals were allotted to five groups which were infected with *Babesia* spp and *A. marginale*. Infections with *Babesia* spp were obtained using subcutaneous inoculation of 5×10^8 infected erythrocytes or by infestation with *Boophilus microplus* larvae originated from *Babesia*-infected female ticks. *A. marginale* infection was attained by subcutaneous inoculation of 5×10^8 infected erythrocytes simultaneously or seventeen days after animals had been inoculated with *Babesia* spp. Prepatent period and parasitemia were determined by examining daily prepared blood smears; packed cell volume (PCV) was weekly determined by the microhematocrit technique and rectal temperature was daily measured twice a day. Treatment was established based on these parameters. Immune response for *A. marginale* was measured by the indirect fluorescent antibody technique. All animals were challenged with blood infected with

A. marginale 56 (two groups) and 73 (three groups) days after inoculation. Although animals had been inoculated with *Babesia*spp only data related to *A. marginale* are presented in this paper. Prepatent period ranged from 19.8 to 26.0 days; mean parasitemia at the beginning of treatment was 2.0% and mean number of treatment/animal varied from 3.2 to 4.4. Lower PCV values were found after the peak of parasitemia by *A. marginale* before and after challenge. Rectal temperatures were higher in the afternoon during clinical anaplasmosis. Higher titers of anti-*A. marginale* antibodies (1:5120) were found 49 days after inoculation. An increase in titers were found up to 48 days after challenge, when the observations were finished.



SUMÁRIO

	Página
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - LITERATURA CONSULTADA	3
2.1 - Premunicação	3
2.2 - Parasitemia por <i>A. marginale</i>	6
2.3 - Volume globular	10
2.4 - Temperatura retal	13
2.5 - Sorologia para <i>A. marginale</i>	15
3 - MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 - Local e duração	19
3.2 - Animais	19
3.3 - Premunicação	20
3.3.1 - Inóculo utilizado	20
3.3.2 - Obtenção de larvas de <i>Boophilus microplus</i>	21
3.3.3 - Inoculação	22
3.4 - Determinação da temperatura retal	22
3.5 - Colheita de material e exames laboratoriais	23
3.5.1 - Esfregaços sanguíneos	23
3.5.2 - Cálculo da parasitemia	23
3.5.3 - Determinação do volume globular	23
3.5.4 - Sorologia para <i>A. marginale</i>	24
3.5.4.1 - Antígeno utilizado na RIFI	24
3.5.4.2 - Conjugado utilizado na RIFI	25
3.6 - Tratamento dos animais	25

	Página
3.7 - Desafio	25
3.8 - Análise estatística	26
4 - RESULTADOS	27
4.1 - Parasitemia e tratamentos realizados	27
4.2 - Volume globular	28
4.3 - Temperatura retal	29
4.4 - Sorologia para <i>A. marginale</i>	29
5 - DISCUSSÃO	55
5.1 - Premunicação	55
5.2 - Parasitemia e tratamentos	55
5.3 - Volume globular	58
5.4 - Temperatura retal	59
5.5 - Sorologia para <i>A. marginale</i>	60
6 - CONCLUSÕES	62
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64



1 - INTRODUÇÃO

A anaplasmose e a babesiose, hemoparasitoses que fazem parte do complexo "tristeza parasitária bovina", são endêmicas nas regiões tropicais e subtropicais e se constituem em fatores limitantes ao desenvolvimento da indústria agropecuária, devido às perdas econômicas causadas indiretamente, como redução no ganho de peso e na produção e mesmo diretamente, pela mortalidade ocasionada, principalmente, em animais importados ou criados em confinamento (JAMES et al, 1985).

A importação de bovinos tem assumido, nos últimos anos, um grande destaque na pecuária mineira. A incorporação destes animais ao rebanho é precedida por um período de adaptação, quando se realiza a premunicação. Este processo visa desenvolver imunidade contra hemoparasitos, que não existem nos países de origem e que são letais para os bovinos não imunizados. Os hemoparasitos classicamente utilizados neste processo pertencem aos gêneros *Anaplasma* e *Babesia*.

O *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910) é uma rickettsia, causadora da anaplasmoze, doença que se caracteriza por uma anemia progressiva, associada à presença de corpúsculos de inclusão nos eritrócitos (RISTIC, 1977).

Vários têm sido os métodos empregados no processo de premunição de animais importados. A falta de padronização destes métodos e a ausência de parâmetros que possam ser utilizados na avaliação do estado imunitário dos animais levam, às vezes, à obtenção de resultados imprevisíveis e não satisfatórios ao término da premunição (LIMA, 1991).

Este trabalho visa obter informações sobre a resposta humoral, parasitemia, volume globular, temperatura retal e resposta ao tratamento quimioterápico frente ao *A. marginale*, com antígeno previamente padronizado e após desafio com inoculação de sangue de animal infectado; e avaliar a influência da época de inoculação de *Babesia* spp. sobre o curso da infecção e da resposta humoral para *A. marginale*. Em animais da raça Limousin, importados dos Estados Unidos, submetidos à premunição. Buscando, desta maneira, obter parâmetros que possam auxiliar na melhoria e maior segurança no emprego deste processo.

Embora os animais tenham sido inoculados com *Babesia* spp., os dados referentes à infecção por estes parasitos não serão utilizados neste trabalho, por se constituírem em objetivo de outro projeto em andamento e pela ausência de antígeno específico.



2 - LITERATURA CONSULTADA

2.1 - Premunicação

SERGEANT et al (1924) denominaram premunicação ao tipo de proteção associada à permanência do agente no hospedeiro. Esta proteção é induzida através da presença do parasito no organismo animal e desaparece após sua eliminação.

STEPHAN e ESQUIBEL (1929) relataram as grandes perdas ocorridas nas primeiras importações de reprodutores no Brasil, que oscilaram entre 90 e 97% de mortalidade. Segundo eles o sucesso da premunicação depende fundamentalmente dos doadores, que devem ser bovinos velhos e constantemente carrapatados.

Em 1950, MACHADO descreve o sistema de premunicação utilizado pelo Departamento da Produção Animal, Secretaria da Agricultura do Estado de Minas Gerais, no qual era utilizado o sangue proveniente de animal portador de piro e anaplasmosose como inóculo.

SILVA e RANALI (1957), em seu trabalho sobre "tristeza bovina", concluíram que a "tristeza" é um sério problema para o gado

importado no Brasil e que a solução deste problema está na prática da premunição, associada ao tratamento quimioterápico e antibiótico. Relatam ainda, que a premunição transforma o animal sã em portador crônico dos parasitos, estabelecendo uma relação de equilíbrio entre eles e o organismo animal.

RANALI et al (1957) descreveram a premunição feita em 47 fêmeas, importadas, nas quais utilizaram como tratamento o Ganaseg (droga que ainda estava em experimentação) e a tetraciclina, obtiveram resultados plenamente satisfatórios.

ZARAZA e KUTTLER (1971) compararam a imunização de bezerros e novilhas holandesas, em premunição, inoculados com vacina atenuada de *A. marginale* e com sangue oriundo de bezerro esplenectomizado infectado com *A. marginale* e desafiados a campo. Concluíram que a vacinação com *A. marginale* atenuado foi apenas parcialmente efetiva, tendo em vista o grande número de reinfecções na época do desafio.

KUTTLER (1972) não recomenda, na premunição, o uso de *A. marginale* virulento como inóculo, principalmente em animais adultos, a não ser que a doença possa ser controlada por terapia específica.

TODOROVIC e TELLEZ (1975) obtiveram resultados satisfatórios com o uso do Ganaseg para controle da infecção por *Babesia*, por ser uma droga eficaz e de fácil aplicação, o mesmo não acontecendo com a combinação Gloxazone-oxitetraciclina, que mostrou-se efetiva no controle das reações pós-inoculação de *A. marginale*, mas de pouca praticidade para sua aplicação no campo.

Em 1975, TODOROVIC et al, na Colômbia, trabalhando com bovinos importados, demonstraram que a vacinação simultânea contra *Babesia* spp. e

A. marginale pode ser feita sem problemas de reações severas após inoculação, se for utilizado um tratamento quimioterápico apropriado. O gado imunizado deve ser acompanhado de perto, para que não ocorram problemas. Apontam como variáveis responsáveis por resultados inconsistentes pós inoculação, o volume de sangue usado como inóculo, o número de parasitos, a infectividade e virulência dos parasitos, a patogenicidade dos parasitos, o armazenamento do sangue desde a colheita até o momento do uso, idade e grau de sangue dos animais e tratamentos (produtos químicos e dosagens) utilizados.

KUTTLER e JOHNSON (1977) afirmam que mesmo que ocorram variações entre amostras de *Babesia* e *Anaplasma*, a premunição parece ser o método que produz o maior nível de resistência à infecção e que em condições tropicais ela é, provavelmente, o procedimento de imunização mais eficaz. Apesar de haver riscos, eles são mínimos se comparados àqueles ocasionados pela introdução de bovinos, susceptíveis e não protegidos, em áreas enzoóticas.

BRASIL (1982) descreve um método de premunição contra a "tristeza parasitária" em bovinos a campo, para bezerros e bovinos adultos. Utiliza várias inoculações de sangue, resfriado ou não, de doadores e o Ganaseg e a tetraciclina como quimioterápicos, além de tratamentos suporte, quando necessário.

Em 1987, BANGEL Jr. et al desenvolveram um método de premunição, diminuindo a necessidade de acompanhamento diário do animal, utilizando um esquema de aplicação do imidocarb e oxitetraciclina após inoculação com sangue fresco e após desafio, obtendo resultados satisfatórios.

PAYNE et al (1990) citam como desvantagens do uso de sangue de bovino adulto como inóculo para premunição, o perigo do uso de parasitos virulentos, a possibilidade do sangue inoculado não conter parasitos suficientes para estabelecer uma infecção e a possibilidade de transmissão de outros patógenos.

LIMA (1991) cita a importância da utilização de inóculo padronizado, contendo número conhecido de hemoparasitos, e da realização de exames dos doadores para verificação da existência de outras doenças que possam ser transmitidas pela inoculação de sangue infectado.

2.2 - Parasitemia por *A. marginale*

MACHADO (1950) trabalhando com 4 bovinos importados da Holanda, inoculados com sangue de animal portador de piro e anaplasnose, encontrou um período de incubação ,para *A. marginale*, de 35 dias com parasitemia de 4,4%, que atingiu um máximo de 18% aos 41 dias após inoculação (DAI), decrescendo até o 61^o DAI, com um valor de 0,1%.

RANALI et al (1957) obtiveram um período de incubação do *A. marginale* variando entre 21 a 38 dias, em 47 fêmeas bovinas, importadas. O tratamento era instituído quando a parasitemia atingia 3%. Doses de tetraciclina de 5 e 7 mg/kg p.v., intramusculares e 2,5 mg/kg p.v., endovenosa, foram 100% eficazes no tratamento da anaplasnose.

KUTTLER (1966), comparando dados clínicos e hematológicos entre diferentes amostras de *A. marginale* e *A. centrale*, em bezerros, novilhas e adultos, encontrou períodos de incubação que variaram de 7,5 a 11 dias para *A. marginale* e parasitemias máximas de 7 a 26%. Testando

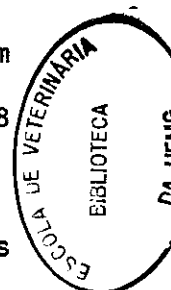
diferentes quantidades de inóculo, observou que a quantidade afeta o período de incubação, mas não afeta o curso da infecção.

MURPHY et al (1966) inocularam experimentalmente animais com *A. marginale*, verificando períodos de incubação que variaram de 15 a 28 dias, com parasitemias máximas de 5 a 11% entre 24 e 28 DAI.

Em 1968, KLAUS e JONES, trabalhando com 5 bezerras intactas (grupo 1) e 6 esplenectomizadas (grupo 2), inoculadas com *A. marginale*, obtiveram período de incubação médio de 38 dias, com o pico de parasitemia ocorrendo em torno de 47^o DAI, sendo a parasitemia máxima de 15 e 34% para os grupos 1 e 2, respectivamente.

ZARAZA e KUTTLER (1971) encontraram um período de incubação médio de 20 dias, para *A. marginale*, em 7 bezerros holandeses de 2 a 4 meses de idade, inoculados com amostra virulenta e uma média de parasitemia máxima de 1,18%. Comparando com animais vacinados com *A. marginale* atenuado, estes animais apresentaram menor decréscimo no volume globular e menores parasitemias, entretanto, quando foram desafiados a campo, apresentaram reações severas devido à anaplasnose, enquanto aqueles que receberam *A. marginale* virulento não apresentaram sinais clínicos da doença.

KUTTLER (1972) inoculou 18 bovinos adultos, 17 bezerros e 16 bezerros esplenectomizados com amostra virulenta de *A. marginale*, de sangue proveniente de um bezerro esplenectomizado. Obteve período de incubação variando de 15,4 a 22,6 dias e parasitemias máximas de 7,1% nos bezerros, 12,1% nos animais adultos e 63,0% nos bezerros esplenectomizados.



TODOROVIC et al (1975), em experimentos com 10 bezerros de 8 meses de idade e 3 bovinos de 2 anos de idade, inoculados com *Babesia* spp. e *A. marginale*, tratados com imidocarb, gloxazone e tetraciclina, verificaram um período de incubação de 17 a 21 dias e parasitemias médias de *A. marginale* inferiores a 1%. Todos os animais quando desafiados com sangue e/ou carrapatos, foram resistentes ao desafio, não necessitando de tratamentos.

TODOROVIC e TELLEZ (1975), em 25 animais de 2 a 3 anos de idade, submetidos ao processo de premunicação, inocularam sangue contendo 10^7 hemácias parasitadas por *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* e submeteram os animais a diferentes esquemas de tratamento. Verificaram um período de incubação para anaplasmose de 21 dias, com uma parasitemia de 0,2%. Todos os animais, após desafio feito 42 DAI, apresentaram parasitemias relativamente altas para *A. marginale* (4-5%). Concluíram, também, que 7 tratamentos com oxitetraciclina na dose de 12 mg/kg p.v. foram relativamente ineficientes para controlar a parasitemia após o desafio.

CARSON et al (1977) inocularam 2×10^8 *A. marginale* em 3 vacas Jersey, adultas, para estudo da premunicação, tratando-as com oxitetraciclina (11 mg/kg p.v.) por 3 a 4 dias, quando a parasitemia estivesse entre 10 e 20% e desafiando-os 60 DAI (1 animal) e 117 DAI (2 animais) com uma dose de 2×10^8 *A. marginale*. Todos os animais foram resistentes ao desafio, não apresentando parasitemia ou decréscimo no volume globular.

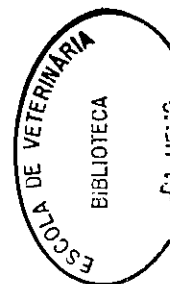
KUTTLER e JOHNSON (1977) trabalharam com 39 novilhas holandesas, com aproximadamente 2 anos de idade, sendo que 9 foram

inoculadas simultaneamente com *Babesia* spp. e *A. marginale*, 10 somente com *A. marginale* e 10 permaneceram como controle, não inoculadas. Tratamentos com oxitetraciclina na dose de 6,6 mg/kg p.v. foram instituídos no 35^o DAI. Verificaram que a inoculação simultânea de *Babesia* spp. e *A. marginale* aumentou o período de incubação do *Anaplasma*, sendo de 36,7 dias em comparação com 28 dias para os animais que não receberam a inoculação de *Babesia*.

AJAYI et al (1978), para verificarem a influência do nível nutricional e fazer estudos clínicos e patológicos em bovinos inoculados experimentalmente com 10^{10} *A. marginale*, utilizaram 39 animais Brahman, de aproximadamente 27 meses de idade, dividindo-os em 4 grupos, sendo 2 inoculados e 2 controles, submetidos a diferentes níveis nutricionais (alto e baixo). Os períodos de incubação foram de 7 e 9 dias e as parasitemias máximas de 9,3 e 8,8% para os grupos com alto e baixo níveis nutricionais, respectivamente. Observaram uma correlação negativa entre parasitemia e anemia, com anemia máxima ocorrendo 2 e 4 dias após o pico de parasitemia. Os autores sugerem que a diferença ocorrida entre os grupos se deve ao nível nutricional, sendo que com baixo nível nutricional as condições são menos favoráveis à multiplicação do parasito.

GONZALES et al (1978) observaram um período de incubação de 12 dias e parasitemia máxima de 4% aos 22 DAI em 10 bezerros de 8 meses de idade inoculados com 10^8 *A. marginale*.

KUTTLER et al (1984), submetendo animais anteriormente premunidos e animais susceptíveis a um desafio com 2 amostras de *A. marginale*, obtiveram período de incubação variando de 23 e 26 dias, com parasitemias máximas de 11 e 2% nos animais previamente premunidos e de 30



e 18% nos animais susceptíveis, para as amostras Flórida e Virgínia de *A. marginale*, respectivamente.

KOHAYAGAWA (1985) trabalhando com 15 animais da raça Fleckvieh, procedentes da Alemanha, em premunição, inoculados com 10ml de sangue proveniente de animal anteriormente premunido, encontrou um período de incubação de 29 dias para *A. marginale*, com parasitemia média acima de 2% entre o 31^o e 49^o DAI. Observou outros 2 picos do *A. marginale* entre o 70^o e 95^o DAI e ao redor do 135^o DAI. O tratamento com uma dose de tetraciclina (10 mg/kg p.v.) foi instituído no 37^o DAI, com uma parasitemia máxima de 9,8%, notando-se a diminuição da parasitemia.

PAYNE et al (1990) imunizaram 102 animais (71 novilhas prenhes e 31 vacas não gestantes) com inóculos de *Babesia* spp. e *A. centrale*, submetendo-as ao desafio a campo. Dos 102 animais, 65 apresentaram *A. marginale* após o desafio e 46 necessitaram de tratamento, apresentando parasitemias máximas de 5 a 10,8%. Concluíram que a imunização com *A. centrale* não previne infecção subsequente com *A. marginale*, entretanto reduz a severidade do desafio.

2.3 - Volume Globular

MACHADO (1950) observou, em bovinos em premunição, uma queda no volume globular (VG), sendo o valor antes da inoculação 37,2% e o VG mínimo 16%, aos 45 DAI, ou seja, 4 dias após a parasitemia máxima por *A. marginale*. Aos 134 DAI o valor do VG já havia se normalizado, sendo de 35%.

KUTTLER (1966) obteve valores mínimos de VG variando de 18 a 20% entre o 12^o e 13^o DAI de *A. marginale* em bezerros, novilhas e adultos. Os valores normais, antes da inoculação variaram de 35 a 39%.

MURPHY et al (1966) observaram que animais experimentalmente infectados apresentaram VG mínimo entre 11 e 15%, 2 a 4 dias após o pico de parasitemia de *A. marginale*.

KLAUS e JONES (1968), inoculando bezerros intactos e esplenectomizados com *A. marginale*, verificaram decréscimos de 50 a 80% no VG, aproximadamente 5 dias após o pico da parasitemia.

RISTIC (1968) descreve que a anemia, na anaplasnose, não é dependente da porcentagem de eritrócitos infectados e sim um resultado de um processo imunológico, o qual é iniciado pela infecção e que depois se desenvolve independentemente, havendo o aparecimento de vários tipos de autohemaglutininas no soro de animais infectados, que opsonizam eritrócitos. Estes são removidos da circulação e degradados em células do sistema monocítico fagocitário. Este processo parece ser o responsável pelas crises severas de anemia frequentemente encontradas em animais com uma parasitemia relativamente pequena.

VELLINI et al (1969) registraram quedas de até 50% no volume globular de bovinos em premunicação, sendo que os valores mínimos ocorreram entre 31 e 53 DAI.

ZARAZA e KUTTLER (1971), testando diferentes sistemas de imunização contra anaplasnose, obtiveram, em animais inoculados com amostra virulenta de *A. marginale*, VG mínimo correspondente a 70% do valor inicial.

KUTTLER (1972), em animais adultos e bezerros esplenectomizados ou não, observou valores de VG antes da inoculação de *A. marginale* variando de 32,9 a 36,8% e, após a inoculação, estes valores variaram entre 8,5% (nos animais esplenectomizados) e 19,5%. Verificou uma longa duração do período de anemia (aproximadamente 26 dias) em animais adultos e bezerros, com valores de VG abaixo de 75% do valor inicial. Concluiu que apesar dos animais estarem com aparência normal, o baixo VG poderia influenciar em ganhos de peso, produtividade e susceptibilidade a outras doenças.

TODOROVIC et al (1975) inocularam simultaneamente *Babesia* spp. e *A. marginale* em bezerros e bovinos adultos e observaram valores mínimos de VG 3 a 4 semanas após inoculação, sendo de 4 a 7 dias após o pico de parasitemia do *A. marginale*.

TODOROVIC e TELLEZ (1975), realizando experimentos com bovinos adultos em premunicação, na Colômbia, verificaram uma queda de 25% no valor do VG, correspondendo à fase de parasitemia por *A. marginale*. Após o desafio foi observada recrudescência de anaplasmose, acompanhada de uma rápida redução no VG.

KUTTLER e JOHNSON (1977) registraram, em novilhas em premunicação, VG antes da inoculação de $30 \pm 1,9\%$, que decresceu devido à parasitemia por *A. marginale* e atingiu um valor mínimo de $20 \pm 4\%$. A infecção simultânea com *Babesia* spp. não influenciou na resposta dos animais no que se refere ao VG, apesar de haver influenciado no aumento do período de incubação do *A. marginale*.

AJAYI et al (1978) encontraram, em animais inoculados com 10^{10} *A. marginale* e submetidos a níveis nutricionais diferentes, valores

mínimos de VG de 25,5 e 18,3%, 4 e 2 dias após o pico da parasitemia, para os grupos com baixo e alto nível nutricional, respectivamente.

FAN et al (1980) observaram em bovinos da raça Charolesa submetidos à premunição, os valores mais baixos do VG no 35^o DAI, que coincidiram com o período de parasitemia do *A. marginale* e com a liberação máxima de reticulócitos pela medula óssea.

KUTTLER et al (1984) obtiveram quedas no VG após desafio com 2 amostras de *A. marginale*, em animais anteriormente premunidos. O percentual máximo de redução no VG foi de 64,2 e 29,0%, para as amostras Flórida e Virgínia, respectivamente.

GOFF et al (1985) verificaram em 14 bovinos adultos, VG antes da inoculação de *A. marginale* variando de $41,5 \pm 0,7\%$ a $39,3 \pm 2,1\%$ e após inoculação, estes valores atingiram um mínimo de $18,5 \pm 0,7$ a $12,8 \pm 1,0\%$. Observaram, também, recrudescência da anaplasmose em 3 animais, aos 70, 71 e 169 DAI.

KOHAYAGAWA (1985) verificou que bovinos da raça Fleckvieh, em premunição, apresentaram valores médios de VG, na fase de parasitemia do *A. marginale*, de $20,20 \pm 3,7\%$ e a campo estes valores variaram de $25,83 \pm 5,32$ a $30,10 \pm 6,48\%$. Antes da inoculação o valor médio de VG foi de $34,76 \pm 3,22$.

PAYNE et al (1990) observaram redução de 50% no VG, em animais que apresentaram recrudescência de *A. marginale* após desafio.

2.4 - Temperatura retal

MACHADO (1950) observou variações na temperatura retal de bovinos submetidos à premunição, a partir de 21 DAI até 49 DAI,

coincidindo com as fases de multiplicação de *Babesia* spp. e *A. marginale*. A temperatura máxima observada foi de 40,2°C, 39 e 41 DAI.

RANALI et al (1957) verificaram elevação da temperatura retal durante a fase de parasitemia por *Babesia* e *A. marginale*, em bovinos em premunição. Observaram que a temperatura voltava aos valores normais dentro de 24 horas, quando o tratamento foi eficaz.

KUTTLER (1966) registrou temperaturas máximas variando de 40,1 a 40,5°C em animais inoculados experimentalmente com *A. marginale*.

TODOROVIC et al (1975) encontraram temperaturas mais elevadas no período da tarde, durante as fases parasitêmicas de *Babesia* e *A. marginale*, em animais experimentalmente infectados.

AJAYI et al (1978) verificaram que animais inoculados com *A. marginale* e submetidos a baixos níveis nutricionais não apresentaram elevações de temperatura durante a fase de parasitemia do *A. marginale*, o mesmo não acontecendo com os animais que receberam altos níveis nutricionais, nos quais a temperatura máxima ocorreu antes mesmo do pico de parasitemia.

KOHAYAGAWA (1985) registrou temperaturas retais médias variando de 38,42±0,27 a 38,76±0,22°C no período da manhã e de 38,57±0,25 a 38,74±0,24°C no período da tarde, em bovinos da raça Fleckvieh, submetidos à premunição, antes da inoculação. Após a inoculação, foram observadas elevações de temperatura na fase de parasitemia por *Babesia*. Durante a fase de parasitemia por *A. marginale*, a temperatura retal variou de 38,12±0,96 a 38,77±0,56°C no período da manhã e de 38,43±0,27 a 39,22±0,58°C no período da tarde.

2.5 - Sorologia para *A. marginale*

MURPHY et al (1966) utilizaram a reação de fixação de complemento (RFC) para demonstrar a resposta de anticorpos (IgM e IgG) face a infecção por *A. marginale*. Observaram títulos crescentes a partir do 7^o DAI, atingindo um máximo (1:2560) entre 25 e 32 DAI, coincidindo com a maior queda de volume globular, decrescendo então, até atingir valores mínimos (1:160 a 1:40) 80 DAI.

KUTTLER (1966) verificou títulos máximos de 1:1280 e 1:640 na RFC, em bezerros esplenectomizados, experimentalmente inoculados com amostras de *A. marginale* e *A. centrale*, respectivamente. Comparando os títulos máximos para *A. marginale* em bezerros, novilhas e adultos, obteve os valores de 1:640, 1:640 e 1:1280, respectivamente.

KLAUS e JONES (1968) detectaram, em bezerros de 4 meses de idade, anticorpos contra *A. marginale* através da RFC, aos 32 (30-33) DAI, atingindo o máximo 40 (36-45) DAI, permanecendo constantes até 90 DAI, quando começaram a decrescer. Aos 65 DAI foi observado um pequeno decréscimo, correspondente ao período de queda da IgM e ascensão da IgG. Não foram encontradas evidências de que a sequência IgM-IgG está relacionada com anticorpos protetores específicos, que devem ocorrer na anaplasmose. Animais que atingiram o pico de imunoglobulinas mais cedo, tiveram níveis de parasitemia menores.

VELLINI et al (1969) verificaram que de 4 animais em premunicação, o animal que apresentou sintomatologia mais acentuada foi o animal que alcançou maior índice de gama globulina circulante ao final da premunicação.

TODOROVIC et al (1975) registraram o aparecimento de anticorpos fixadores de complemento para *A. marginale* 16 DAI.

KUTTLER e JOHNSON (1977) observaram que animais vacinados com amostra virulenta de *A. marginale* apresentaram reações mais severas e também um título de anticorpos significativamente mais alto do que aqueles vacinados com *A. marginale* atenuado.

WILSON et al (1978), comparando 4 métodos sorológicos (aglutinação capilar, fixação de complemento, aglutinação em placa e imunofluorescência indireta), obtiveram resultados semelhantes entre RFC e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), sendo o primeiro mais sensível. Em 9 animais Hereford e 10 Brahman-Shorthorn inoculados com 10^{10} *A. marginale* observaram títulos médios, na RIFI, de 1:71,5 sete dias após inoculação, atingindo o pico, 1:5210, aos 29 DAI, declinando após este dia e permanecendo em níveis detectáveis até, pelo menos, 200 DAI (1:84).

GONZALES et al (1978) compararam a RFC, RIFI e "card test" para o diagnóstico da anaplasose bovina e verificaram que os títulos máximos (1:160 na RFC e 1:1280 na RIFI) ocorreram 22 DAI, coincidindo com a época de parasitemia máxima. Seis semanas após a inoculação (SAI), os títulos da RIFI caíram para 1:640 e então permaneceram constantes até 10 SAI, enquanto na RFC os títulos atingiram níveis baixos (1:10) na 10^a SAI. Observaram que os títulos da RFC decrescem mais rapidamente do que na RIFI, pois 14 SAI já estavam abaixo do nível de sensibilidade na RFC, ao passo que na RIFI eles permaneceram acima do nível de sensibilidade (1:40) por, pelo menos, 20 semanas.

AKINBOADE e DIPEOLU (1984) testaram 200 soros de bovinos através da RIFI, para *A. marginale*, obtendo 136 (68%) de positivos, sendo o título máximo observado de 1:10240, em 61 animais (30,5%).

KUTTLER et al (1984) observaram um estímulo no crescimento dos títulos da RFC após desafio com amostras homólogas e heterólogas de *A. marginale*, em 8 vacas previamente infectadas.

MONTENEGRO-JAMES et al (1985) vacinaram 27 animais, de 1 a 2 anos, com *A. marginale* atenuado, permanecendo 10 animais como controle, não vacinados. Todos os animais foram desafiados com sangue contendo $2,5 \times 10^9$ *A. marginale*, 3 meses após a vacinação. Após o desafio todos os animais desenvolveram parasitemias patentes. Os animais vacinados tornaram-se positivos à RIFI, 2 semanas após imunização (SAI), com título médio de 1:93. Os títulos foram crescentes, atingindo um máximo de 1:618, 5 SAI, decrescendo para valores basais ($\leq 1:40$) até a época do desafio. Seis semanas após o desafio, os títulos médios atingiram o pico (1:49448). Nos animais não vacinados, anticorpos anti-anaplasma começaram a aumentar 3 SAI, alcançando o pico (1:32510) num período de 7 semanas.

GOFF et al (1985) desenvolveram um teste de imunofluorescência indireta para anaplasose bovina, utilizando a microfluorometria e verificaram ser este teste mais sensível do que a RFC e ter um grau de acuidade muito maior do que a RIFI utilizando a determinação visual. Títulos considerados positivos à determinação visual, mostraram-se negativos quando examinados pela microfluorometria. Observaram também, que os títulos de anticorpos na RIFI têm duração mais prolongada que na RFC.

GOFF et al (1990), comparando a sonda de DNA, RIFI e RFC para diagnóstico de *A. marginale* em bovinos, demonstraram ser a RIFI e a sonda

de DNA consideravelmente mais sensíveis na detecção de animais portadores do que a RFC. A RIFI e a sonda de DNA apresentaram um percentual de concordância de 90,8%.

KROON et al (1990) utilizaram a RIFI para diagnóstico sorológico em 9 bezerros esplenectomizados e inoculados com *A. marginale*. Dois animais que foram inoculados com grande quantidade de sangue (1,5 litros) estavam positivos, com títulos $\geq 1:5120$, 2 SAI, os quais foram mantidos até 31 SAI. Os outros animais apresentaram títulos crescentes a partir da 3^a SAI, que permaneceram constantes até, pelo menos, 11 SAI.

SHKAP et al (1990) compararam o teste de ELISA com a RIFI para diagnóstico da anaplasose e observaram um grau de sensibilidade similar entre eles. Citaram como principal desvantagem da RIFI, a avaliação subjetiva da fluorescência.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Local e duração

A premunicação foi realizada na Fazenda Mata Velha, município de Capitólio, MG, no período de abril a setembro de 1991. Os exames sorológicos foram realizados no laboratório de protozooses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária da UFMG. Os exames parasitológicos foram realizados na própria fazenda ou no laboratório.

3.2 - Animais

Foram utilizados 39 animais, da raça Limousin, de ambos os sexos, com idade aproximada de 24 meses, importados dos Estados Unidos.

Após a chegada os animais foram submetidos ao exame clínico e receberam tratamento anti-helmíntico com cloridrato de levamisol¹ e acaricida com flumetrina².

1 - Ripercol - Cyanamid Química do Brasil Ltda.

2 - Bayticol Pour-on - Bayer do Brasil S/A.

Os animais ficaram alojados em estábulos de alvenaria, onde receberam alimentação padronizada, consistindo de volumoso constituído de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado, ração balanceada em quantidade limitada e mistura mineral e água à vontade.

Os animais tiveram acompanhamento veterinário durante todo o período do experimento.

3.3 - Premunicação

3.3.1 - Inóculo utilizado

O inóculo foi preparado a partir de sangue de animais naturalmente infectados com *Babesia* spp. ou *A. marginale*, procedentes do município de Campo Florido (MG), e padronizado de maneira a obtermos uma quantidade conhecida de 5×10^8 eritrócitos infectados com *Babesia* ou *A. marginale*/ml de sangue. A padronização foi feita através da determinação do volume globular e da contagem de eritrócitos parasitados, em esfregaços sanguíneos corados pela solução corante de Giemsa, examinados em microscópio óptico³, com objetiva de imersão (100 X).

Os animais doadores foram, anteriormente, submetidos a exames para detecção de outras doenças que poderiam ser transmitidas pela inoculação de sangue contaminado (leucose, brucelose, leptospirose, diarréia bovina à vírus, rinotraqueíte infecciosa bovina).

3 - Olympus - Mod. YS T

O inóculo foi mantido em nitrogênio líquido (-196°C), utilizando o dimetilsulfóxido⁴ (DMSO) como crioprotetor e era descongelado à temperatura ambiente imediatamente antes da inoculação.

A inoculação foi feita através da administração de 1ml de inóculo/animal, pela via subcutânea.

3.3.2 - Obtenção de larvas de *Boophilus microplus*



Larvas de *B. microplus* foram utilizadas para inoculação de *Babesia* spp. Estas larvas foram obtidas a partir de fêmeas ingurgitadas provenientes de animais naturalmente infectados por *Babesia* spp., do município de Capim Branco (MG), que foram mantidas para postura em condições de laboratório (estufa para demanda bioquímica de oxigênio, temperatura de 28°C e umidade relativa superior a 80%).

As posturas dos três primeiros dias foram descartadas e o restante dos ovos foi colocado em seringas plásticas, tampadas com rolhas de algodão e mantidas nas mesmas condições anteriores, para eclosão.

Após a eclosão, cada seringa continha, em média, 2000 larvas, que foram utilizadas entre 12 a 20 dias de idade.

A infestação foi feita através da distribuição das larvas diretamente sobre o dorso dos animais.

4 - DMSO - Merck-Schuchardt

3.3.3 - Inoculação dos animais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos e foram inoculados como descritos a seguir.

Grupo 1 - composto por 9 animais (3 fêmeas e 6 machos), inoculados com *A. marginale* no dia 0 e com *Babesia* spp. sete dias após a inoculação (DAI) do *Anaplasma*.

Grupo 2 - composto por 5 animais (2 fêmeas e 3 machos), infestados com larvas de *B. microplus* e inoculados com *A. marginale*, simultaneamente, no dia 0.

Grupo 3 - composto por 10 animais (10 fêmeas), infestadas com larvas de *B. microplus* no dia 0 e inoculadas com *A. marginale* 17 DAI.

Grupo 4 - composto por 5 animais (5 fêmeas), inoculadas com *Babesia* spp. e *A. marginale*, simultaneamente, no dia 0.

Grupo 5 - composto por 10 animais (7 fêmeas e 3 machos), inoculados com *Babesia* spp. no dia 0 e com *A. marginale* 17 DAI.

3.4 - Determinação da temperatura retal

A temperatura retal de cada animal foi determinada diariamente, pela manhã e à tarde, durante todo o período do experimento. Os dados foram anotados em formulários próprios.

3.5 - Colheita de material e exames laboratoriais

3.5.1 - Esfregaços sanguíneos

Foram preparados esfregaços de sangue capilar, obtido na extremidade da cauda, diariamente, de todos os animais, durante os primeiros 30 dias do experimento ou até que fosse detectada a parasitemia por *A. marginale*. Após este período, esfregaços foram feitos sempre que a temperatura fosse igual ou superior a 39,5°C ou que o animal apresentasse sinais clínicos de hemoparasitoses.

Os esfregaços eram corados pelo Giemsa e observados em microscópio óptico, em objetiva de imersão, para o diagnóstico parasitológico.

3.5.2 - Cálculo da parasitemia

A parasitemia para *A. marginale* foi determinada através da contagem de eritrócitos parasitados ao exame de 50 campos microscópicos (aproximadamente 15000 células) e era expressa em forma de percentual.

3.5.3 - Determinação do volume globular

O volume globular, de cada animal, foi determinado antes da inoculação, semanalmente até o final do experimento e sempre que necessário, principalmente durante o período clínico da doença, através da técnica de microhematócrito.

3.5.4 - Sorologia para *A. marginale*

Sangue venoso de cada animal foi colhido antes da inoculação e em intervalos semanais, remetido ao laboratório, sob refrigeração, para obtenção do soro, que foi separado, identificado e armazenado em frascos de 2ml, a -20°C, até a época de ser examinado.

Os soros foram diluídos em solução salina tamponada (PBS, pH 7,2), em diluições múltiplas a partir de 1:40 e examinados através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI). O título de anticorpos foi fornecido pelo inverso da maior diluição em que houve fluorescência.

3.5.4.1 - Antígeno utilizado na RIFI

O antígeno foi preparado através da inoculação venosa de sangue positivo para *A. marginale* em bezerro esplenectomizado, que foi acompanhado diariamente através de esfregaços sanguíneos, corados pelo Giemsa, para determinação da parasitemia.

Quando a parasitemia atingiu 17%, sangue jugular foi colhido, em tubos vacutainer com anticoagulante, e processado conforme as normas recomendadas pelo Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura (IICA, 1987).

3.5.4.2 - Conjugado utilizado na RIFI

Foi utilizado o conjugado caprino anti-bovino, produzido no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, segundo a técnica empregada no Laboratório "Dr. Mario Fatala Chanben", Argentina⁵.

O título do conjugado utilizado foi de 1:60.



3.6 - Tratamento dos animais

A instituição de tratamento nos animais foi baseada nos resultados dos exames parasitológicos, volume globular, temperatura retal e sinais clínicos.

Para a babesiose foi utilizado o diaceturato de 4,4 diazoaminodibenzamidina⁶, na dose de 3,5 mg/kg p.v., pela via intramuscular, em dose única e para a anaplasiose, o cloridrato de tetraciclina⁷, na dose de 10 a 15 mg/kg p.v., endovenoso, cuja duração foi determinada através da reação dos animais e exames clínicos e laboratoriais.

3.7 - Desafio

Todos os animais foram desafiados com sangue oriundo de animal da raça Limousin, importado da França, que havia sido submetido ao

5 - Laboratório Sanitário "Dr. Mário Fatala Chanben" da Dirección de Enfermedades Transmisibles da Secretaría de Estado de Salud Pública, Buenos Aires, Argentina. 10p. Mimeografado.

6 - Ganaseg - Squibb

7 - Talcin - Ciba-Geigy Química S/A

processo de premunição em Dezembro de 1990 e que apresentava parasitemia por *A. marginale* e *Babesia* spp. A inoculação foi feita pela via subcutânea, com 3ml de sangue, correspondendo a uma dose de $8,4 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ e $6,7 \times 10^6$ eritrócitos parasitados/animal, para *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*, respectivamente. Os animais dos grupos 1, 2 e 4 foram desafiados para *A. marginale* com 73 dias de inoculação e os dos grupos 3 e 5, com 56 dias após inoculação.

Após o desafio foram adotados os mesmos procedimentos laboratoriais, clínicos e terapêuticos empregados quando da primeira inoculação.

3.8 - Análise estatística

Foram calculadas as médias e desvios padrão para as diversas variáveis em estudo. A comparação entre médias de títulos de anticorpos foi efetivada utilizando-se os resultados da análise de variância, através do teste "t" de Student. Foram utilizados os logarítimos das médias para a realização do teste.



4 - RESULTADOS

4.1 - Parasitemia e tratamentos realizados

Os resultados de parasitemia para *A. marginale* e tratamentos com cloridrato de tetraciclina encontram-se nas tabelas I a VI, para os diversos grupos.

O período prepatente mínimo foi de 17 dias e o máximo de 36 dias e a variação média foi de 19,9 a 26 dias.

O início do tratamento foi em média de 0,9 a 3,2 dias após o aparecimento da parasitemia, tendo uma duração média de 1 e máxima de 6 dias, sendo a média de 3,2 dias para o grupo 4 e de 4 ou mais dias para os demais grupos.

A parasitemia média no início do tratamento foi superior a 2,0% para os grupos 1, 2, 3 e 5 e inferior a este valor para o grupo 4 (1,7%).

A parasitemia máxima foi de 7,6% (animal 953, grupo 3), detectada um dia após o início do tratamento. Em média, esta parasitemia variou de 2,2 a 3,7% nos 5 grupos.

Um dia após o final do tratamento, todos os grupos apresentaram uma parasitemia média inferior a 1,0%.

Somente um animal (978, grupo 1) apresentou recrudescência de anaplasiose 48 DAI, atingindo parasitemia de 2,6%, não necessitando, entretanto, de novo tratamento.

Após o desafio, 30 animais apresentaram *A. marginale* detectado nos esfregaços sanguíneos, mas somente 16 deles apresentaram parasitemias superiores a 2% e necessitaram de tratamento. A média das parasitemias máximas destes animais foi de 2,9% e a duração média dos tratamentos foi de 2 dias. Dos 16 animais, 4 eram do grupo 1, 2 do grupo 2, 3 do grupo 3, 3 do grupo 4 e 4 do grupo 5.

As parasitemias médias de cada grupo, antes e após o desafio estão representadas nos gráficos 1 a 5.

4.2 - Volume globular

Os valores médios do volume globular para os 5 grupos estão apresentados na TAB. VII.

Antes da inoculação estes valores foram 38,4, 37,4, 39,3, 44,6 e 40,1% para os grupos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

Após a inoculação houve um decréscimo nestes valores, sendo que o percentual médio de redução em relação ao valor inicial variou de 10,2 a 19,3. Os valores mínimos ocorreram entre 28 e 42 DAI.

Antes do desafio, os valores médios do volume globular estavam menores do que os valores iniciais e o percentual médio de redução do volume globular após o desafio, em relação aos valores anteriores variou de 16,6 a 33,0, com os valores mínimos ocorrendo de 41 a 55 dias após o desafio.

O volume globular médio, para cada grupo está representado nos gráficos 6 a 10.

4.3 - Temperatura retal

As temperaturas retais médias antes da inoculação, no período da manhã foram 38,7, 38,7, 38,4, 38,4 e 38,5°C e no período da tarde 39,4, 38,6, 38,8, 38,7 e 38,7°C para os grupos 1 a 5, respectivamente.

Temperaturas retais médias acima de 39,5°C foram registradas, após a inoculação e após o desafio, principalmente no período da tarde, na fase de parasitemia de *A. marginale*, em todos os grupos.

As médias das temperaturas retais máximas observadas durante as fases de parasitemia do *A. marginale* foram de 40,1 e 40,1, 40,0 e 39,9, 40,0 e 40,0, 39,6 e 39,8, 39,8 e 39,7 para os grupos 1 a 5, após inoculação e após desafio, respectivamente.

As temperaturas retais médias, no período da manhã e à tarde, para cada grupo, estão representadas nos gráficos 11 a 15.

4.4 - Sorologia para *A. marginale*

Todos os animais estavam negativos à RIFI, para *A. marginale* antes da inoculação e sete DAI. No 14^o DAI um animal do grupo 3 e dois

animais do grupo 5 apresentaram sorologia positiva (título 1:40). Os valores dos títulos foram crescentes, com média de títulos máximos ocorrendo 49 DAI, a partir do qual houve um decréscimo gradativo até a época do desafio. Os grupos 3 e 5 apresentaram títulos médios estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) dos demais, no 35^o e 42^o DAI (TAB. VIII).

Os títulos médios por ocasião do desafio eram de 1:1728 para o grupo 3 e 1:1188 para o grupo 5, desafiados 56 DAI, e de 1:493, 1:576 e 1:480, respectivamente, para os grupos 1, 2 e 4 inoculados aos 73 DAI. Quatro dias após o desafio, a média de títulos estava com valores abaixo daqueles observados por ocasião do desafio. Os valores então foram crescentes até o 48^o DAD. Houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre o título médio do grupo 3 e o dos grupos 1, 2 e 4, 11 DAD (TAB. IX).

O título máximo obtido, em todos os grupos, foi de 1:5120 (antes e após o desafio).

O perfil sorológico dos diversos grupos está representado nos gráficos 1 a 5.

TABELA I - Período prepatente, parasitemia e tratamento de animais do grupo 1, da raça Limousin submetidos ao processo de preinoculação para *A. marginale*, em Capitólio (MG), 1991.

Número do Animal	Período Prepatente (Dias)	Início do Tratamento (DAI)	PARASITEMIA (%)				Duração do Tratamento (Dias)
			Início do Tratamento	Máxima	Final do Tratamento	Após Tratamento	
955	21,0	24,0	1,4	2,8	1,5	*	5,0
965	17,0	22,0	1,5	2,5	1,1	0,1	5,0
966	21,0	25,0	1,4	1,9	1,5	0,8	4,0
969	18,0	23,0	1,3	1,6	0,8	0,2	4,0
978	21,0	21,0	0,1	0,1	0,1	0,1	3,0
982	17,0	21,0	5,0	5,0	3,6	0,3	5,0
985	20,0	23,0	1,4	1,7	1,0	0,8	4,0
986	27,0	28,0	2,6	3,5	1,4	0,3	5,0
988	17,0	21,0	7,0	7,0	1,9	0,3	5,0
MÉDIA	19,9	23,1	2,4	2,9	1,4	0,3	4,4

* Dado não registrado

DAI - Dias após inoculação

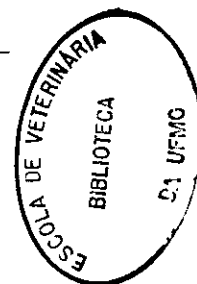


TABELA II - Período prepatente, parasitemia e tratamento de animais do grupo 2, da raça Limousin submetidos ao processo de preinoculação para *A. marginale*, em Capitólio (MG), 1991.

Número do Animal	Período Prepatente (Dias)	Início do Tratamento (DAI)	P A R A S I T E M I A (%)				Duração do Tratamento (Dias)
			Início do Tratamento	Máxima	Final do Tratamento	Após Tratamento	
957	21,0	25,0	3,7	3,7	1,1	*	4,0
962	30,0	30,0	2,7	2,7	1,4	0,2	3,0
970	20,0	22,0	1,5	2,6	1,3	*	5,0
976	21,0	26,0	1,9	2,8	0,7	0,7	4,0
977	25,0	-	-	0,1	-	-	-
MÉDIA	23,4	25,8	2,5	2,9 ¹	1,1	0,5	4,0

* Dados não registrados

¹ Cálculo feito somente com os animais tratados

DAI- Dias após inoculação

TABELA III - Período prepatente, parasitemia e tratamento de animais do grupo 3, da raça Limousin submetidos ao processo de prevenção para *A. marginale*, em Capitólio (MG), 1991.

Número do Animal	Período Prepatente (Dias)	Início do Tratamento (DAI)	PARASITEMIA (%)				Duração do Tratamento (Dias)
			Início do Tratamento	Máxima	Final do Tratamento	Após Tratamento	
950	30,0	32,0	5,8	5,6	2,5	1,0	4,0
953	27,0	28,0	3,0	7,6	2,9	0,7	6,0
958	36,0	36,0	2,9	3,2	1,0	*	5,0
958	29,0	30,0	1,8	3,2	1,8	0,1	6,0
964	24,0	25,0	2,4	2,4	2,0	1,7	5,0
967	21,0	21,0	1,6	2,4	1,1	0,6	4,0
971	23,0	24,0	2,1	6,1	1,1	1,0	6,0
972	25,0	28,0	1,9	1,9	0,8	0,1	4,0
980	23,0	23,0	2,7	2,7	2,2	0,1	4,0
984	22,0	22,0	1,8	1,8	0,7	0,1	3,0
MÉDIA	28,0	28,9	2,6	3,7	1,6	0,6	4,7

* Dado não registrado

DAI - Dias após inoculação

TABELA IV - Período prepatente, parasitemia e tratamento de animais do grupo 4, da raça Limousin submetidos ao processo de prevenção para *A. marginale*, em Capitólio (MG), 1991.

Número do Animal	Período Prepatente (Dias)	Início do Tratamento (DAI)	P A R A S I T E M I A (%)				Duração do Tratamento (Dias)
			Início do Tratamento	Máxima	Final do Tratamento	Após Tratamento	
951	21,0	24,0	1,9	2,3	1,5	1,0	5,0
952	21,0	25,0	1,7	1,7	0,8	0,9	3,0
954	27,0	27,0	1,8	2,8	2,8	0,8	2,0
961	17,0	21,0	3,0	4,0	4,0	1,1	5,0
973	21,0	28,0	0,1	0,1	0,1	0,1	1,0
MÉDIA	21,4	24,6	1,7	2,2	1,8	0,8	3,2

DAI - Dias após inoculação

TABELA V - Período prepatente, parasitemia e tratamento de animais do grupo 5, da raça Limousin submetidos ao processo de premunção para *A. marginale*, em Capitólio (MG), 1991.

Número do Animal	Período Prepatente (Dias)	Início do Tratamento (DAI)	P A R A S I T E M I A (%)				Duração do Tratamento (Dias)
			Início do Tratamento	Máxima	Final do Tratamento	Após Tratamento	
959	25,0	28,0	3,1	4,6	1,2	1,4	5,0
960 ¹	6,0	6,0	1,7	1,7	0,9	0,6	3,0
963	24,0	25,0	3,3	3,3	0,9	0,1	5,0
968	32,0	35,0	3,7	3,7	1,5	*	6,0
974	18,0	21,0	1,8	5,9	2,6	0,1	5,0
975	24,0	24,0	2,2	4,7	1,5	0,1	6,0
979	24,0	25,0	3,0	3,0	1,9	0,1	4,0
981	25,0	29,0	1,3	1,5	0,7	0,1	3,0
983	18,0	24,0	1,5	2,4	1,7	0,1	5,0
987	30,0	34,0	2,4	3,6	1,2	0,1	5,0
MÉDIA	24,4	27,2	2,5	3,6	1,5	0,3	4,9

* Dado não registrado

¹ Animal não utilizado para cálculo

TABELA VI - Período prepatente, parasitemia e tratamento de 5 grupos de animais, da raça Limousin submetidos ao processo de premunicação para *A. marginale*, em Capitólio (MG), 1991.

Grupo	Período Prepatente (Dias)	Início do Tratamento (DAI)	P A R A S I T E M I A (%)				Duração do Tratamento (Dias)
			Início do Tratamento	Máxima	Final do Tratamento	Após Tratamento	
1	19,9	23,1	2,4	2,9	1,4	0,3	4,4
2	23,4	25,8	2,5	2,9	1,1	0,5	4,0
3	26,0	26,9	2,6	3,7	1,6	0,6	4,7
4	21,4	24,6	1,7	2,2	1,8	0,8	3,2
5	24,4	27,2	2,5	3,6	1,5	0,3	4,9

DAI - Dias após inoculação

TABELA VII - Valores médios de volume globular e percentual médio de redução, de 5 grupos de animais da raça Limousin, submetidos ao processo de premunicação para *A. marginale*, em Capitólio (MG), 1991.

Grupo	Número de Animais	Antes da Inoculação	Após inoculação		Antes do Desafio	Após desafio	
			Mínimo/DAI	Percentual Médio de Redução		Mínimo/DAD	Percentual médio de Redução
1	9	38,4	32,2/28	16,2	36,7	28,9/55	21,2
2	5	37,4	33,6/35	10,2	37,0	24,8/48	33,0
3	10	39,3	31,7/32	19,3	38,1	29,8/55	21,8
4	5	44,6	38,6/42	13,5	40,4	31,6/48	21,8
5	10	40,1	35,0/32	12,8	37,9	31,6/41	16,6

DAI - Dias após inoculação

DAD - Dias após desafio

TABELA VIII - Médias dos títulos⁻¹ de anticorpos anti-*A. marginale* através da reação de imunofluorescência indireta de cinco grupos de animais da raça Limousin, submetidos ao processo de premunicação para *A. marginale*, em Capitólio (MG), 1991.

Grupo	Número de Animais	Dias Após Inoculação									
		7	14	21	28	35	42	49	56	63	70
1	9	0	0	40	155	622 ^A	1386 ^A	2133	1920	853	493
2	5	0	0	32	128	608 ^A	1664 ^A	3584	1920	960	576
3	10	0	4	28	248	1984 ^B	2944 ^B	3200	1728	-	-
4	5	0	0	48	120	416 ^A	960 ^A	2048	1760	448	480
5	10	0	8	68	384	1896 ^B	2948 ^B	2888	1188	-	-

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (P<0,05)

DAD - Dias após desafio

TABELA IX - Médias dos títulos⁻¹ de anticorpos anti-*A. marginale* através da reação de imunofluorescência indireta de cinco grupos de animais da raça Limousin, submetidos ao processo de premunicação para *A. marginale*, em Capitólio (MG), 1991.

Grupo	Número de Animais	Dias Após Desafio						
		4	11	18	24	34	41	48
1	9	129	400 ^A	1191	1617	1813	2097	2808
2	5	152	448 ^A	1024	1408	1408	2048	2580
3	10	240	1040 ^B	1792	2304	2208	2208	3584
4	5	152	352 ^A	1024	947	1664	1856	2688
5	10	216	644 ^{AB}	1872	2320	2388	1472	2560

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (P<0,05)



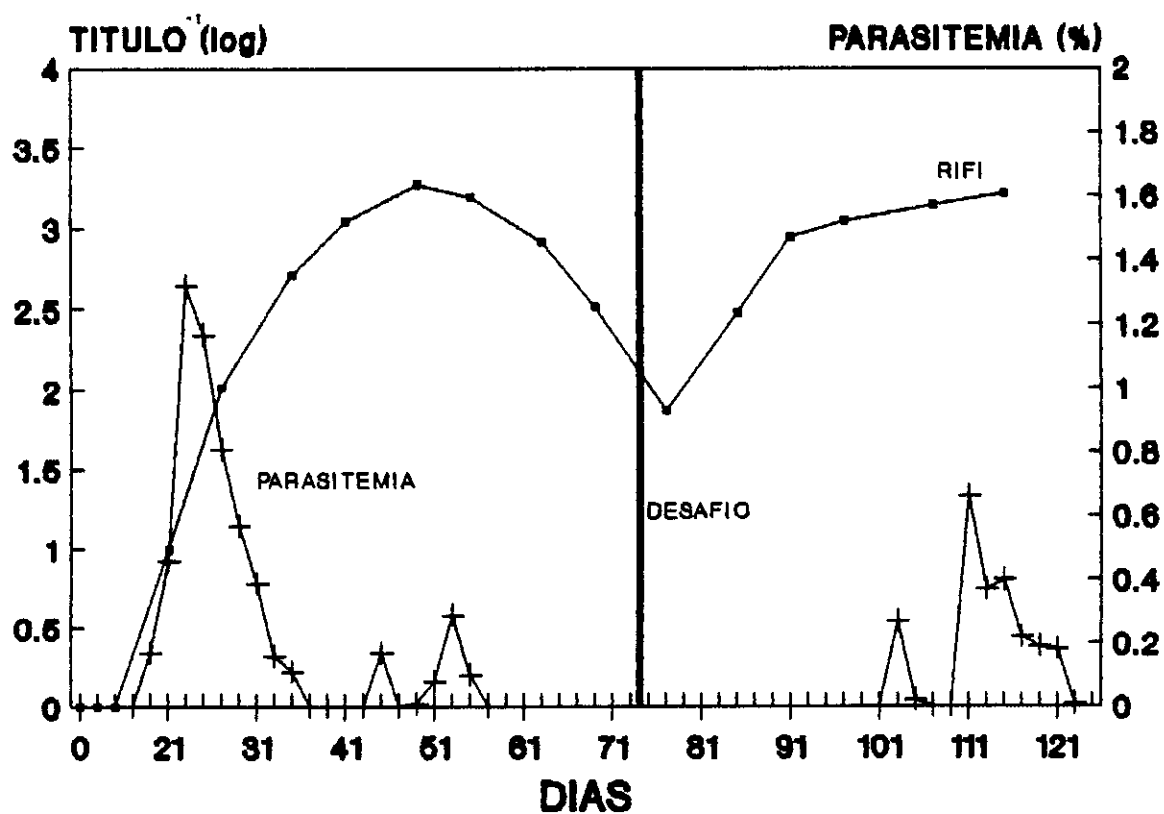


GRAFICO 1 - Perfil sorológico e parasitemia média de *A. marginale* de animais do grupo 1, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunição, em Capitólio (MG), 1991.

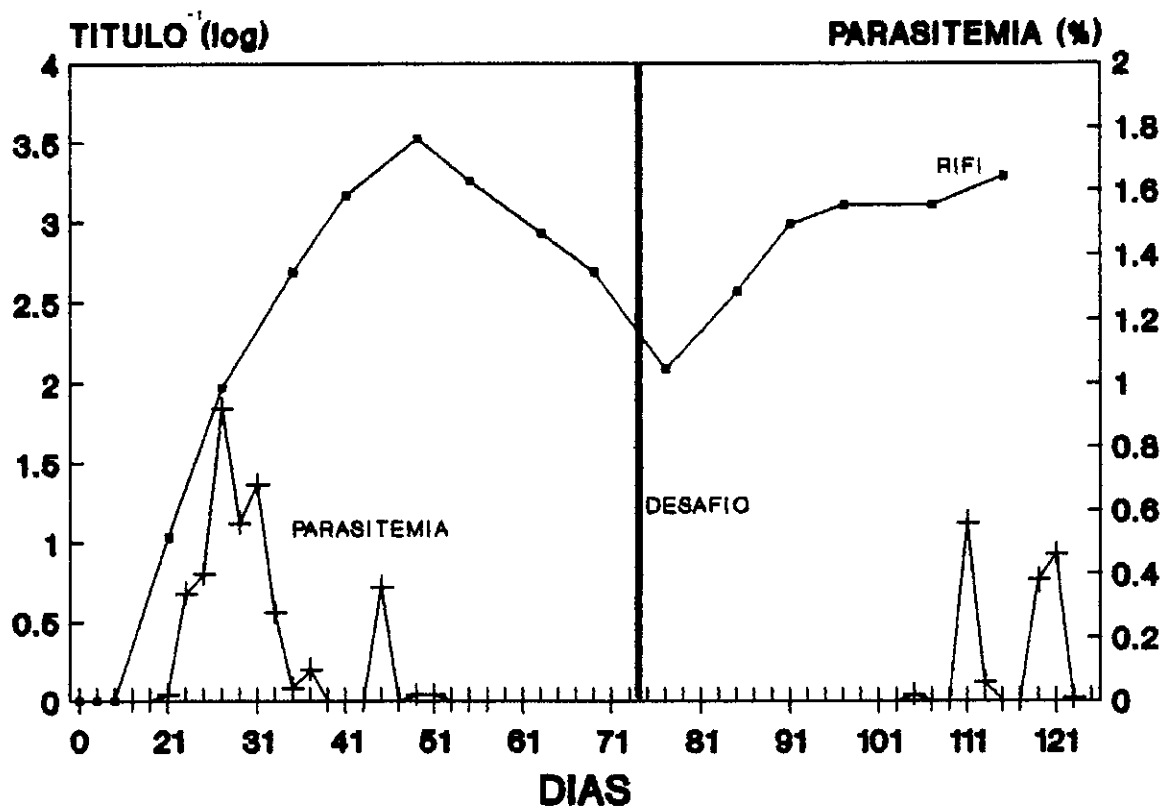


GRAFICO 2 - Perfil sorológico e parasitemia média de *A. marginale* de animais do grupo 2, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunção, em Capitólio (MG), 1991.

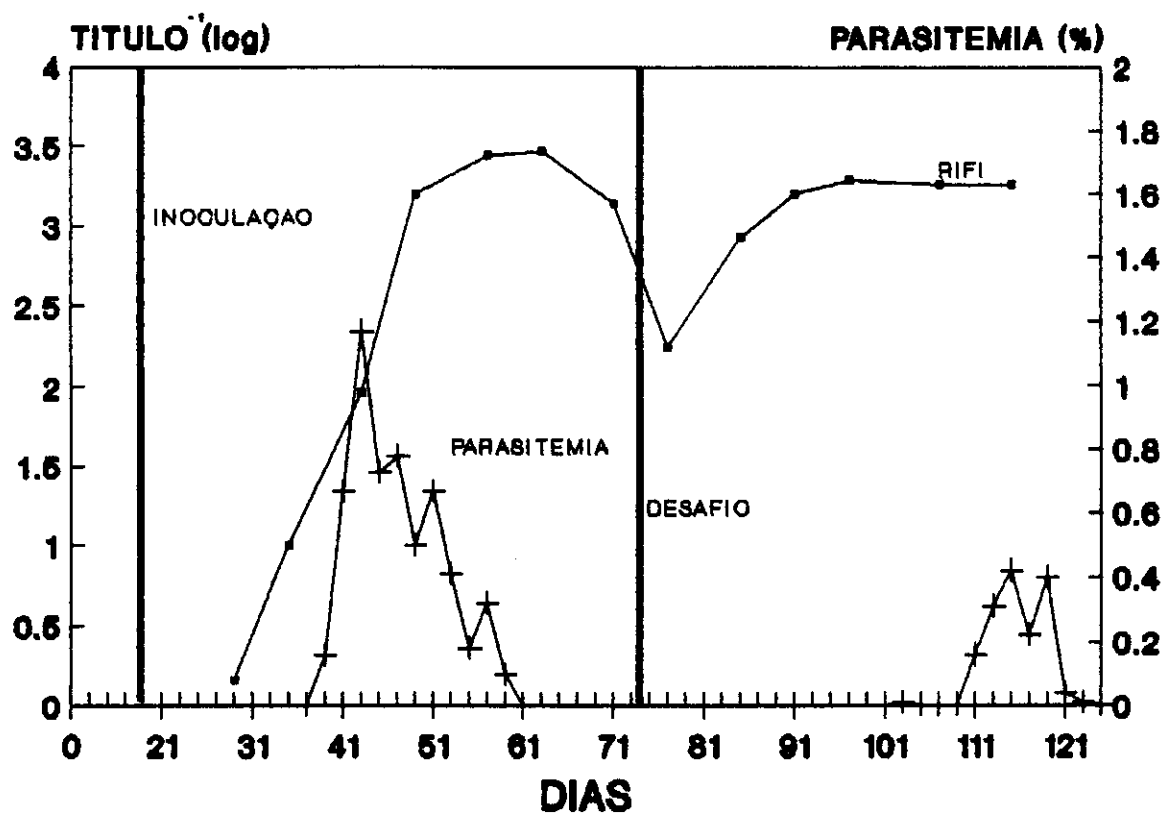


GRAFICO 3 - Perfil sorológico e parasitemia média de *A. marginale* de animais do grupo 3, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunicação, em Capitólio (MG), 1991.

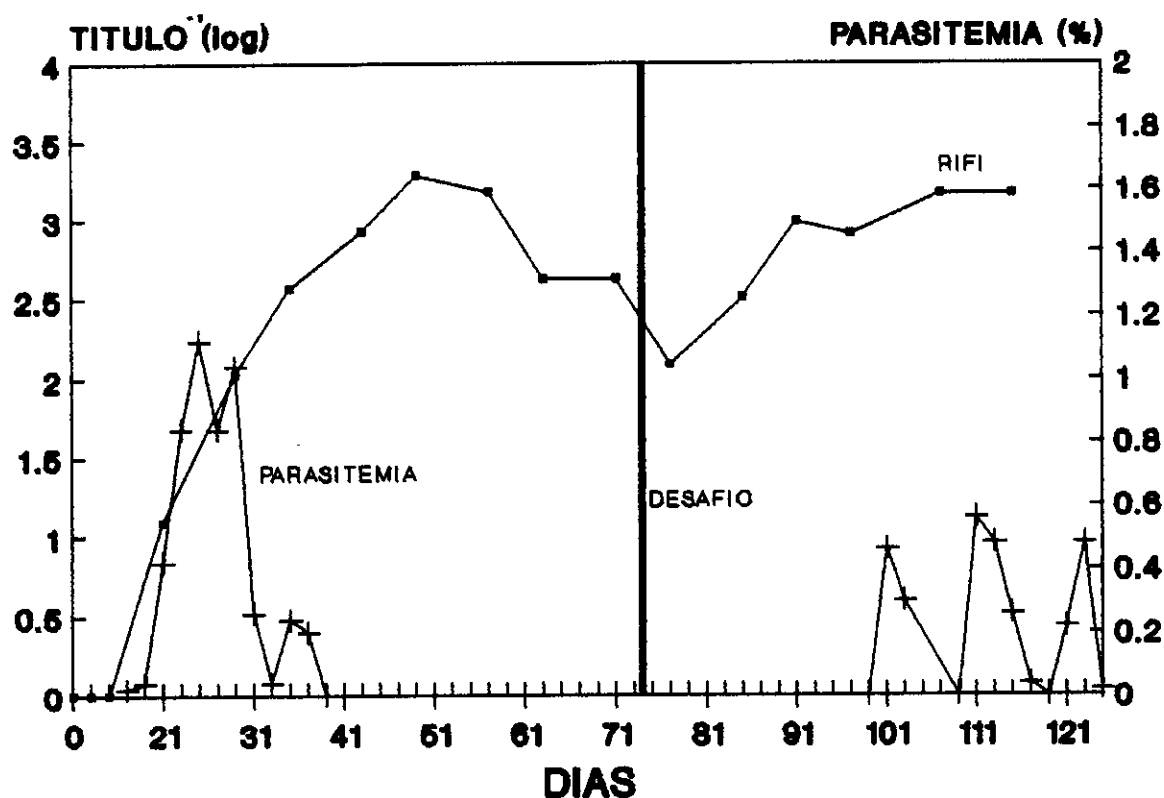


GRAFICO 4 - Perfil sorológico e parasitemia média de *A. marginale* de animais do grupo 4, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunicação, em Capitólio (MG), 1991.

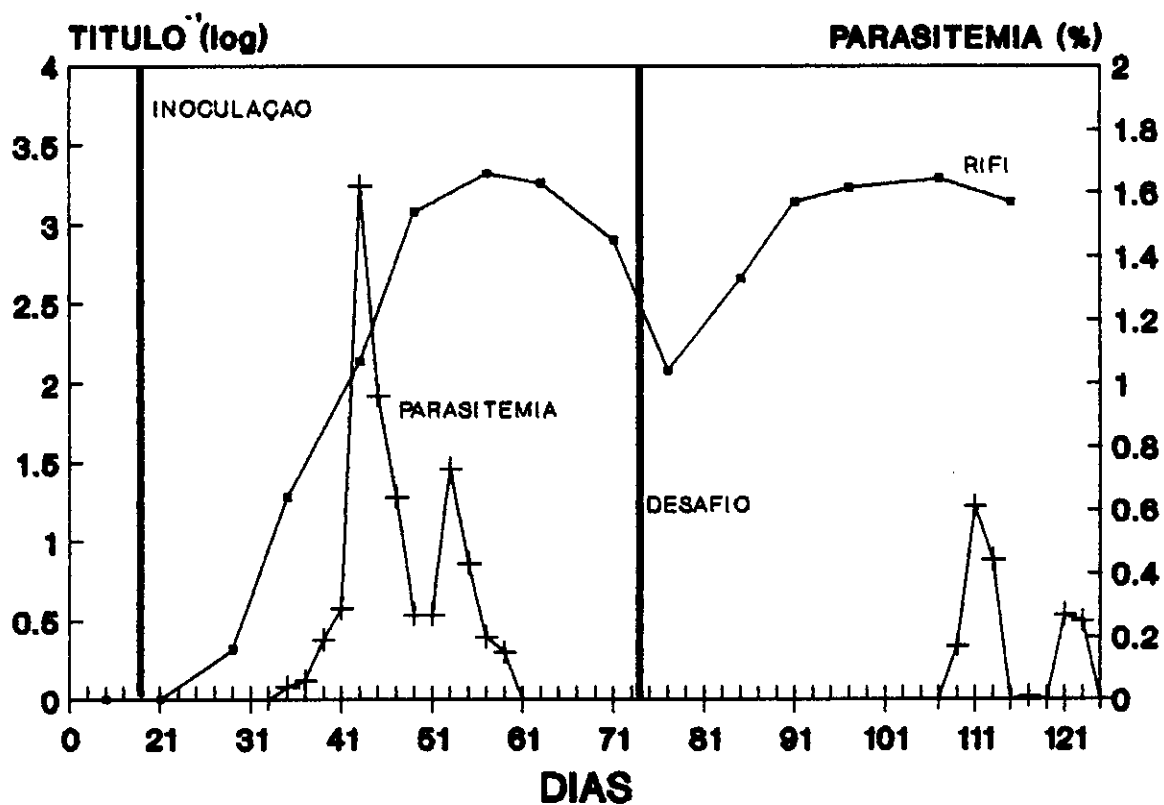


GRAFICO 5 - Perfil sorológico e parasitemia média de *A. marginale* de animais do grupo 5, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunicação, em Capitólio (MG), 1991.

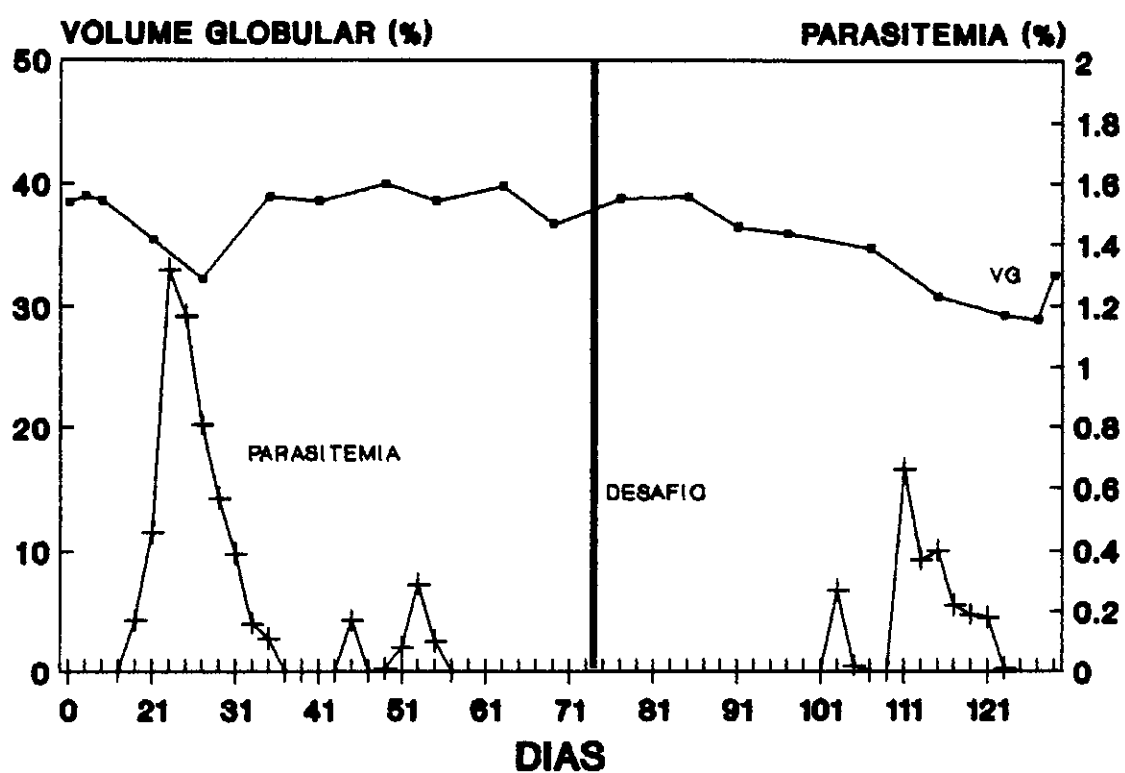


GRAFICO 6 - Volume globular e parasitemia média de *A. marginale* de animais do grupo 1, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunição, em Capitólio (MG), 1991.

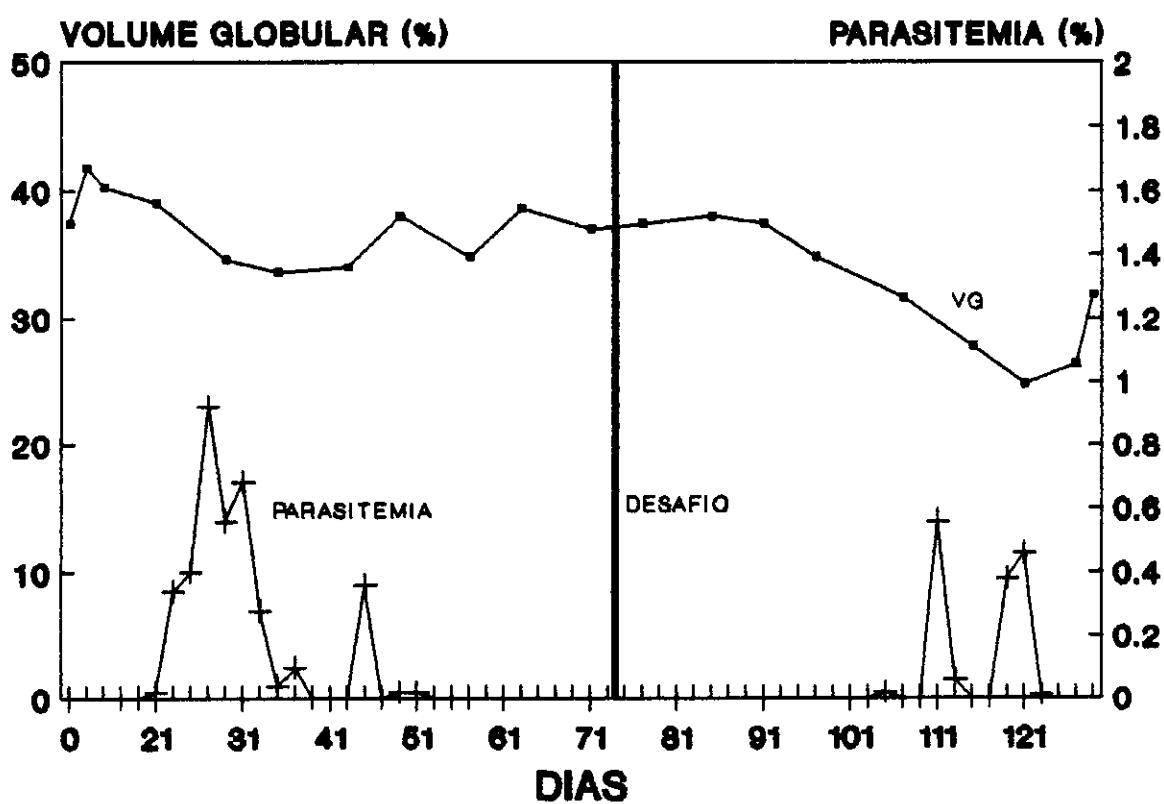


GRAFICO 7 - Volume globular e parasitemia média de *A. marginale* de animais do grupo 2, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunicação, em Capitólio (MG), 1991.

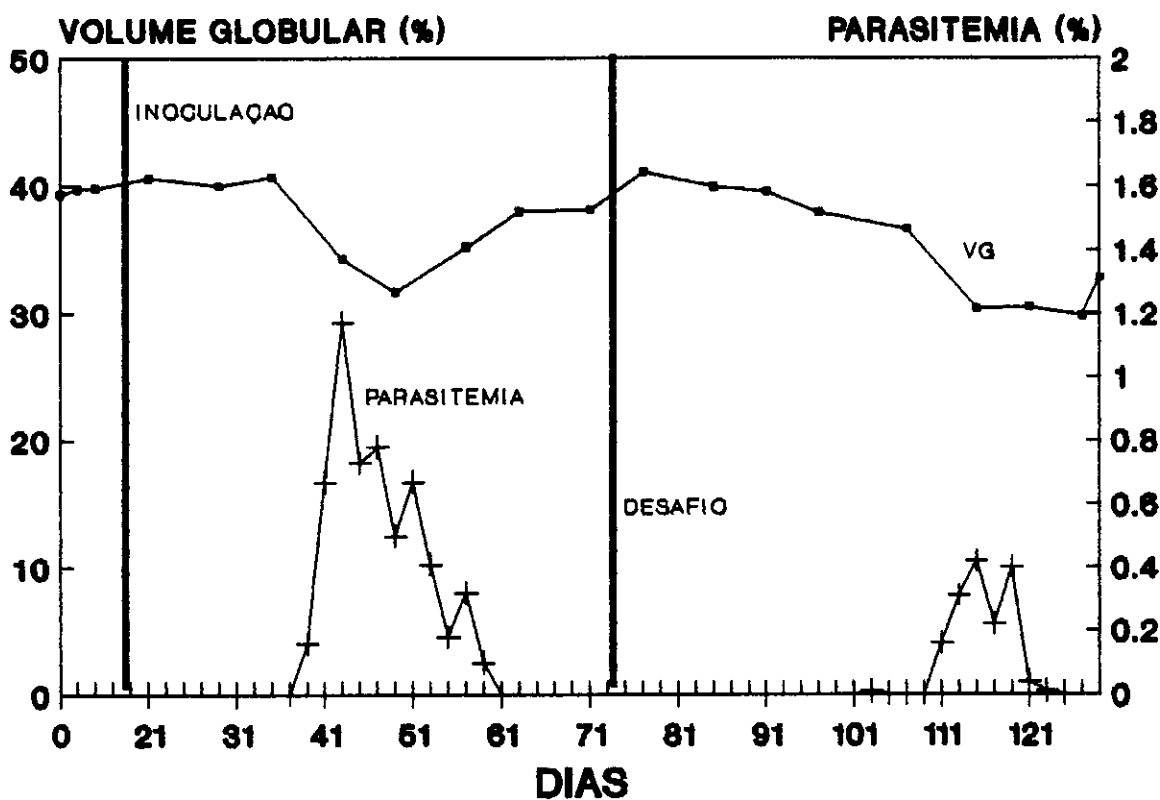


GRAFICO 8 - Volume globular e parasitemia média de *A. marginale* de animais do grupo 3, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunicação, em Capitólio (MG), 1991.

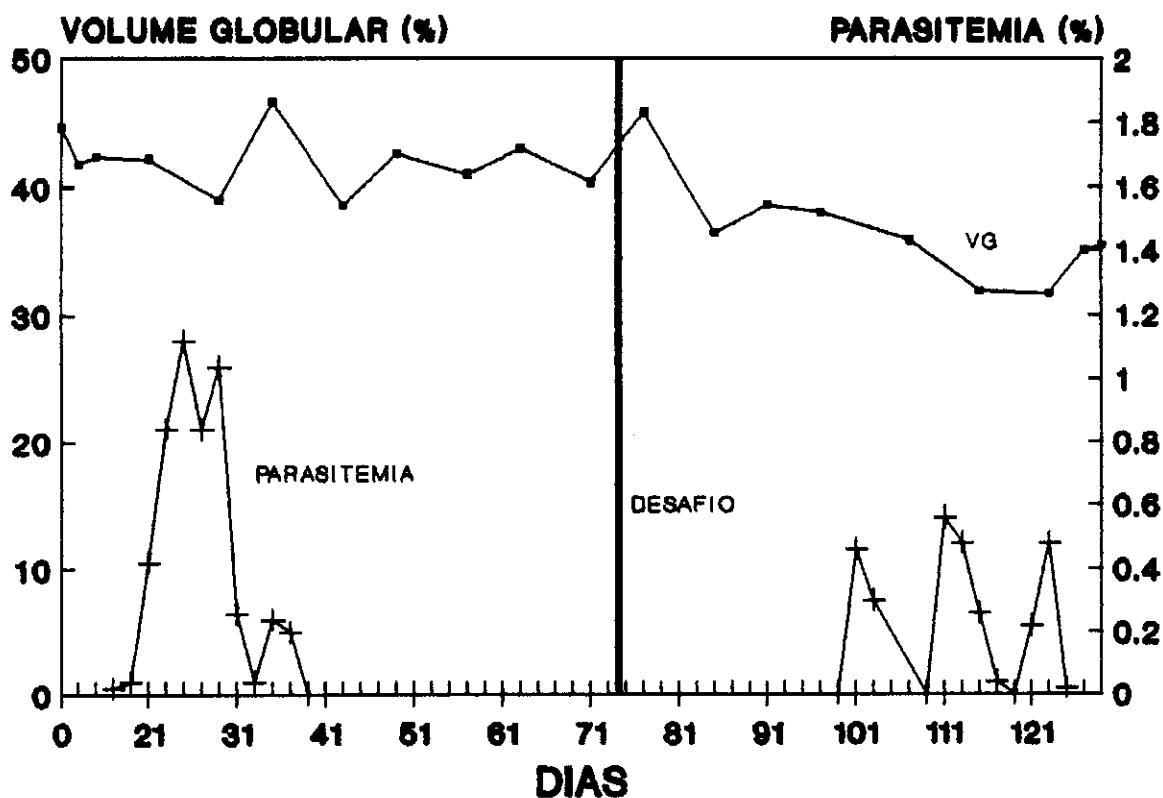


GRAFICO 9 - Volume globular e parasitemia média de *A. marginale* de animais do grupo 4, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunicação, em Capitólio (MG), 1991.

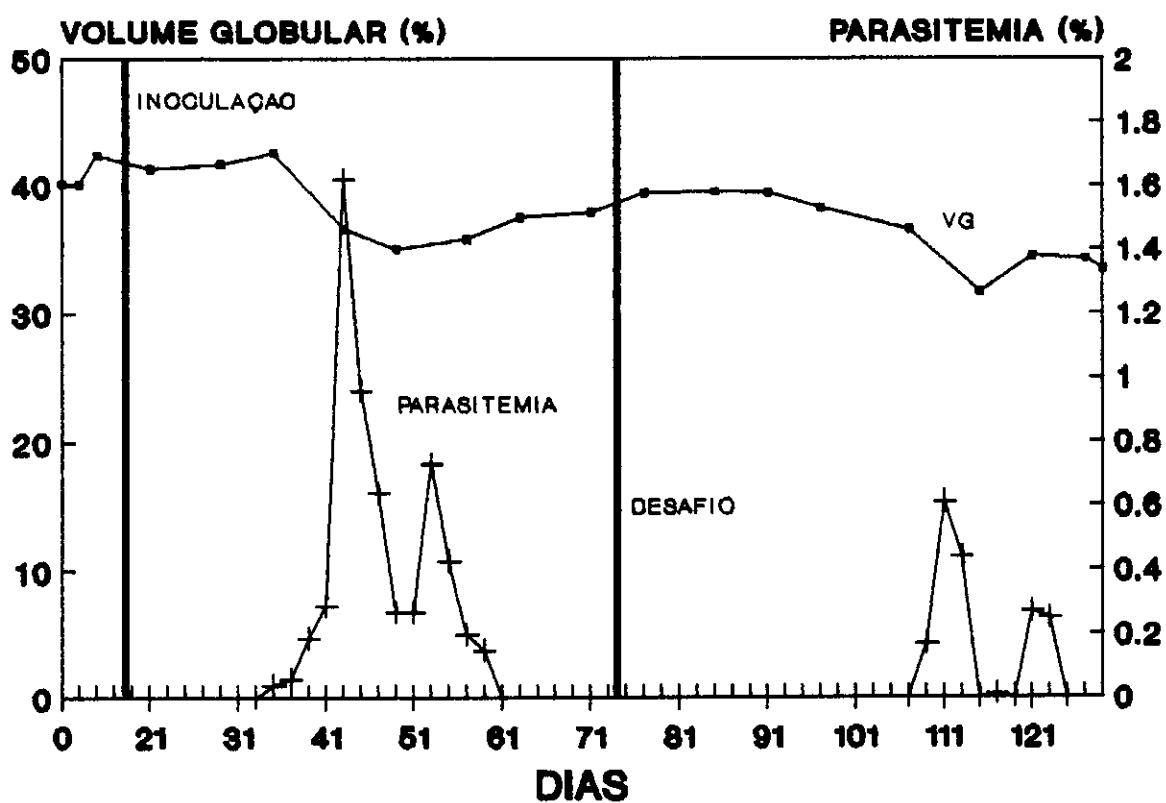


GRAFICO 10 - Volume globular e parasitemia média de *A. marginale* de animais do grupo 5, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunição, em Capitólio (MG), 1991.

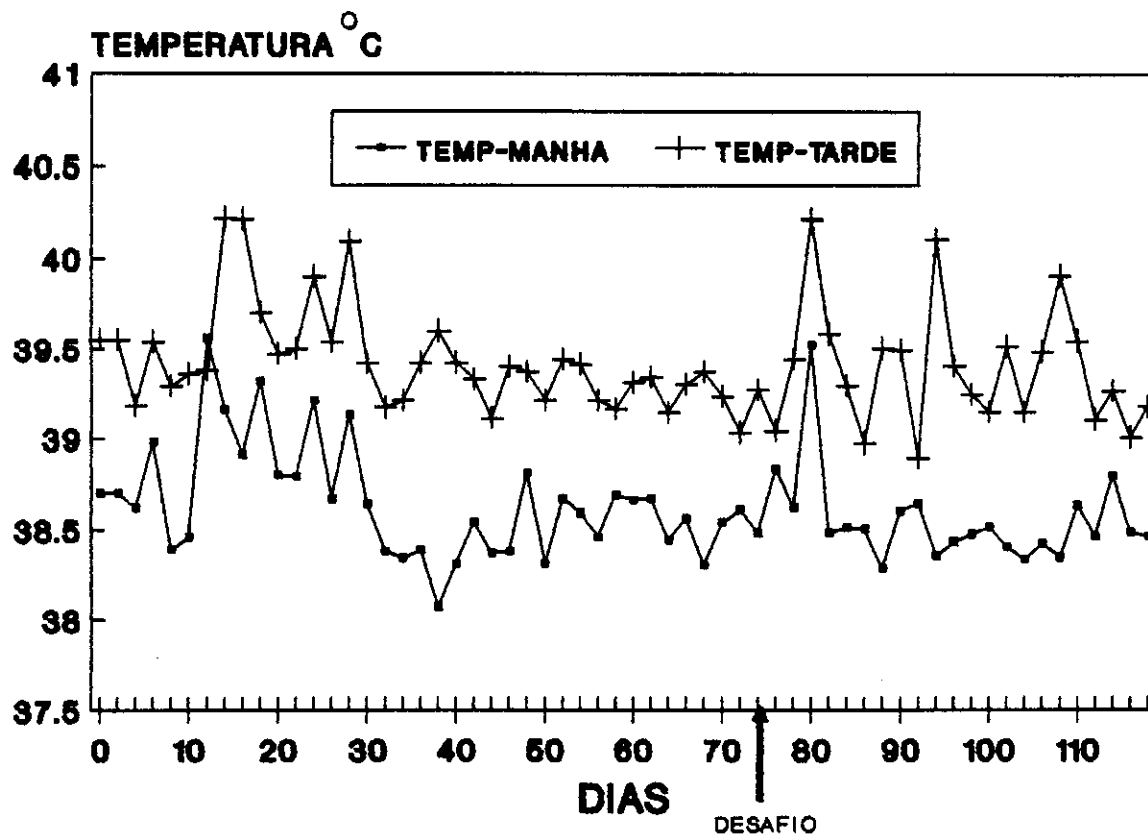


GRAFICO 11 - Temperaturas retais médias, nos períodos da manhã e da tarde de animais do grupo 1, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunição, em Capitólio (MG), 1991.

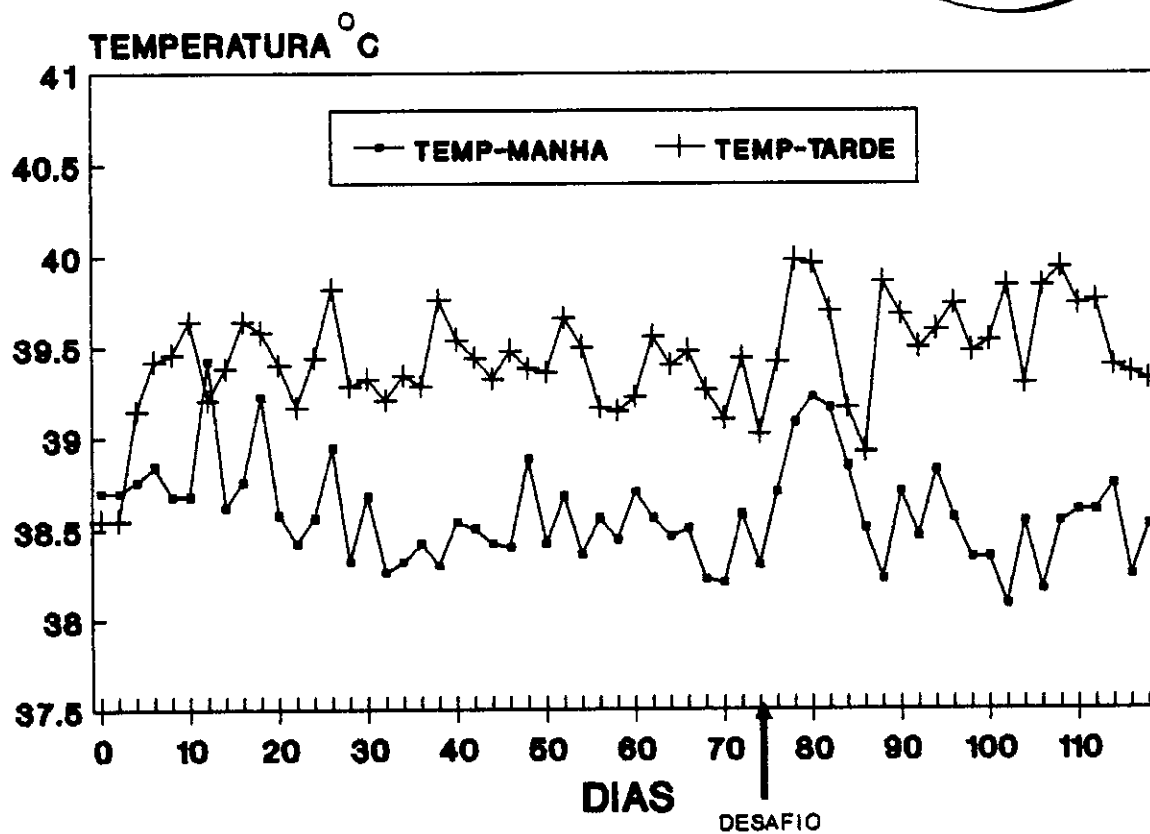


GRAFICO 12 - Temperaturas retais médias, nos períodos da manhã e da tarde de animais do grupo 2, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunição, em Capitólio (MG), 1991.

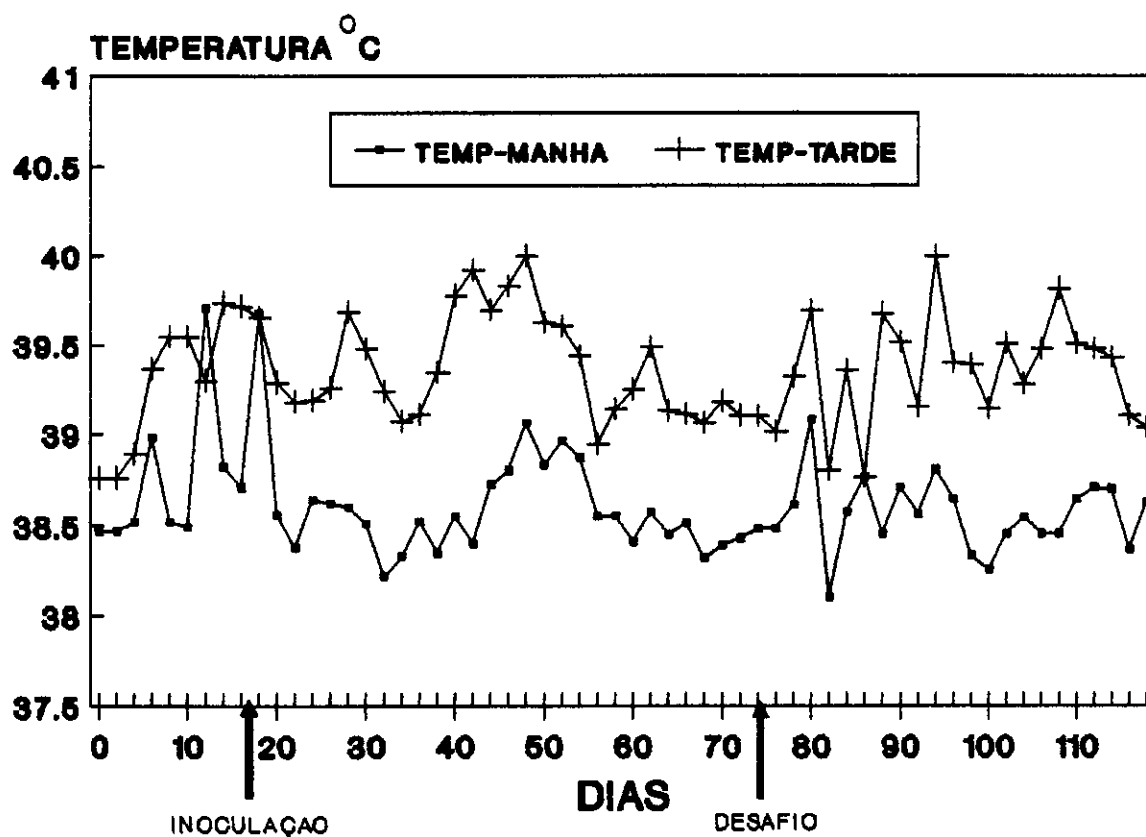


GRAFICO 13 - Temperaturas retais médias, nos períodos da manhã e da tarde de animais do grupo 3, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunição, em Capitólio (MG), 1991.

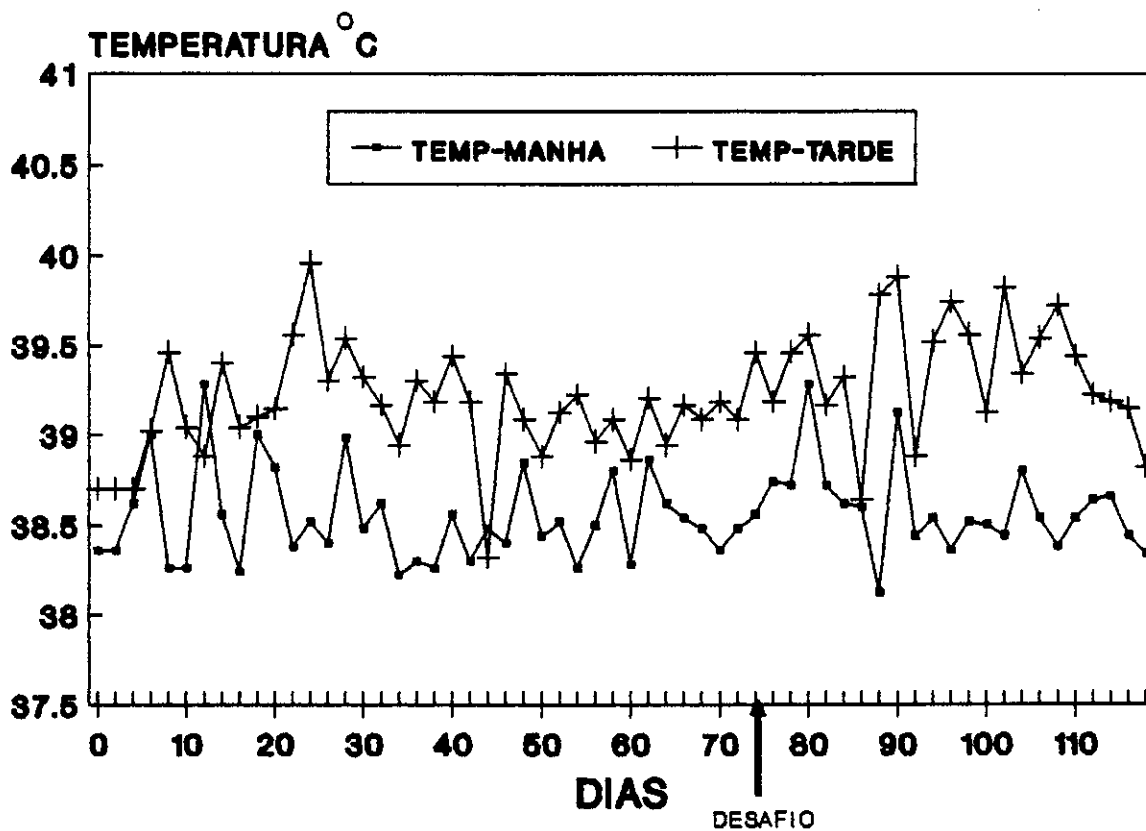


GRAFICO 14 - Temperaturas retais médias, nos períodos da manhã e da tarde de animais do grupo 4, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunicação, em Capitólio (MG), 1991.

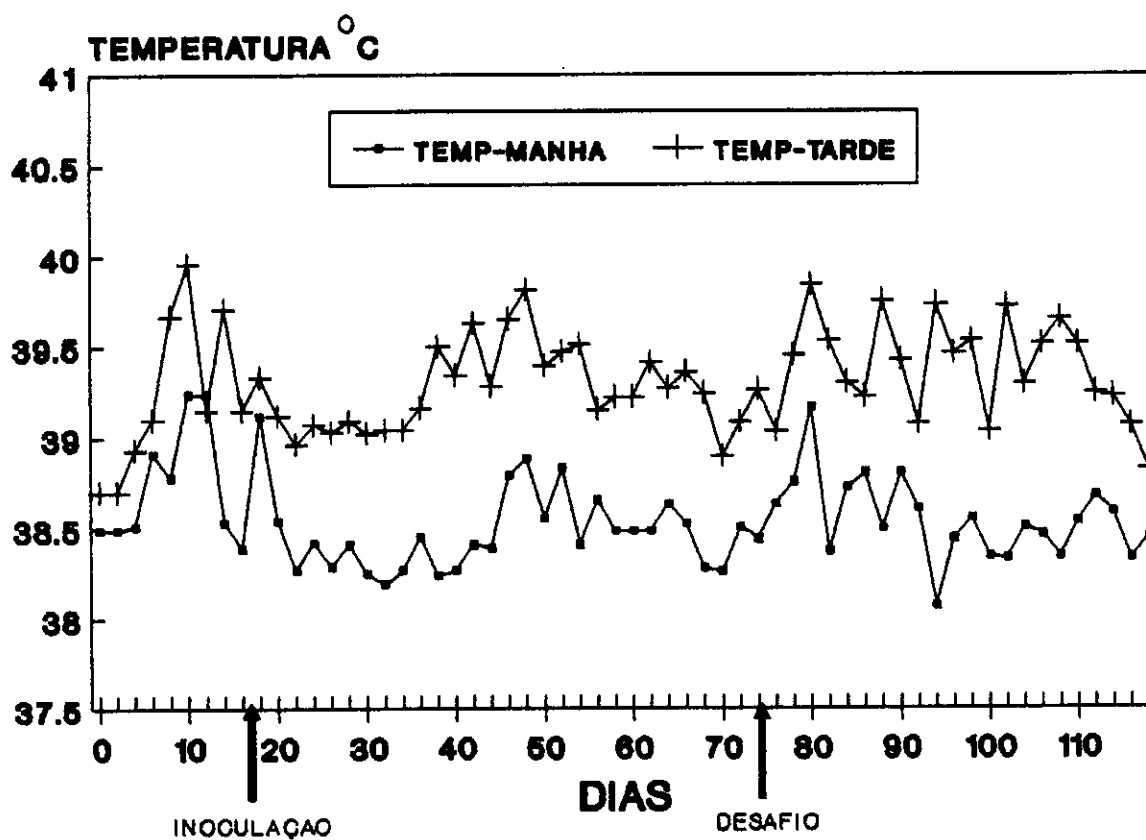


GRAFICO 15 - Temperaturas retais médias, nos períodos da manhã e da tarde de animais do grupo 5, da raça Limousin, submetidos ao processo de premunicação, em Capitólio (MG), 1991.



5 - DISCUSSÃO

5.1 - Premunicação

A utilização de inóculo padronizado, congelado, mostrou ser uma opção viável e eficiente para ser empregada no processo de premunicação. Além de tornar o período prepatente mais uniforme, que favorece a programação das atividades envolvidas no processo, permite um controle mais efetivo das doenças possíveis de serem transmitidas por sangue contaminado, o que nem sempre é possível quando se emprega sangue fresco, colhido de doadores, como nos métodos utilizados por vários autores (MACHADO, 1950, RANALI et al, 1957, KUTTLER, 1972, BRASIL, 1982, BANGEL Jr., 1987).

5.2 - Parasitemia e tratamentos

O período de incubação médio para *A. marginale*, de 19,9 a 26 dias foi semelhante aos encontrados por RANALI et al (1957), MURPHY et al (1966), ZARAZA e KUTTLER (1971), KUTTLER (1972), TOROVIC et al (1975),

TODOROVIC e TELLEZ (1975) e KUTTLER et al (1984), superior aos obtidos por KUTTLER (1966), AJAYI et al (1978) e GONZALES et AL (1978) e inferior aos obtidos por MACHADO (1950), KLAUS e JONES (1968), KUTTLER e JOHNSON (1977) e KOHAYAGAWA (1985). Estas variações podem ser atribuídas à dose inoculada, pois como foi verificado por KUTTLER (1966) a quantidade de inóculo afeta o período de incubação, sem, no entanto, afetar o curso da infecção.

KUTTLER e JOHNSON (1977) verificaram que a inoculação simultânea de *Babesia* spp. e *A. marginale* aumentava o período de incubação do *A. marginale*, esta observação não foi confirmada neste trabalho, no qual os grupos que receberam inoculações simultâneas, apresentaram períodos de incubação menores do que aqueles que receberam inóculos de *Babesia* spp. e *A. marginale* com intervalo de 17 dias. Esta variação provavelmente é devido à amostra utilizada pelos referidos autores, considerando que mesmo nas inoculações com apenas *A. marginale*, obtiveram períodos de incubação maiores do que os encontrados no presente trabalho.

A média de parasitemias máximas variando de 2,2 a 3,7% foi superior àquela encontrada por ZARAZA e KUTTLER (1971) e inferior àquelas observadas por MACHADO (1950), KUTTLER (1966), MURPHY et al (1966), KLAUS e JONES (1968), KUTTLER (1972), CARSON et al (1977), AJAYI et al (1978), GONZALES et al (1978), KUTTLER et al (1984) e KOHAYAGAWA (1985). Provavelmente, o tratamento instituído quando os níveis médios de parasitemia oscilavam entre 1,7 e 2,5% não permitiram que a parasitemia máxima atingisse os níveis observados por aqueles pesquisadores.

A média de 3,2 a 4,8 tratamentos com doses de 10 a 15 mg/kg p.v. de cloridrato de tetraciclina, necessários para se conseguir um controle eficaz da infecção por *A. marginale*, está em concordância com CARSON et al (1977) e difere dos tratamentos utilizados por RANALI et al (1957), KUTTLER e JOHNSON (1977) e KOHAYAGAWA (1985), que com apenas uma dose de tetraciclina, variando de 2,5 a 10 mg/kg p.v., conseguiram controlar a infecção. Esta variação provavelmente está ligada à diferenças nas amostras de *A. marginale* utilizadas como inóculo e à parasitemia no momento do tratamento.

Recrudescência de anaplasmose foi observada por KOHAYAGAWA (1985), com picos de parasitemia semelhantes aos obtidos após a inoculação do 70^o ao 95^o e 135^o DAI e por GOFF et al (1985) 70, 71 e 169 DAI. Neste trabalho somente um animal, que havia sido tratado anteriormente com uma parasitemia de 0,1%, apresentou recrudescência 48 DAI, não sendo necessária a instituição de novo tratamento. Este resultado demonstra que a intervenção terapêutica foi feita no momento adequado.

A ocorrência de parasitemia e a necessidade de tratamento, em alguns animais, após o desafio está em concordância com os achados de TODOROVIC e TELLEZ (1975) e KUTTLER et al (1984). Apesar desta ocorrência, notou-se uma média de parasitemia e do número de tratamentos necessários para controlar a infecção bem inferiores àqueles valores obtidos após a inoculação. Estas recidivas podem estar relacionadas à diferenças das amostras utilizadas como inóculo e como desafio. Resultados semelhantes foram observados por KUTTLER et al (1984) que encontraram diferenças em resposta quando utilizaram amostras heterólogas.

5.3 - Volume globular

Os valores médios de volume globular antes da inoculação foram superiores àqueles verificados por MACHADO (1950), KUTTLER (1966), KUTTLER (1972), KUTTLER e JOHNSON (1977) e KOHAYAGAWA (1985). Estas diferenças devem estar relacionadas a fatores ligados à raça dos animais.

Os valores mínimos do volume globular ocorreram 3 a 7 dias após o pico da parasitemia, semelhante ao encontrado por MACHADO (1950), KUTTLER (1966), MURPHY (1966), KLAUS e JONES (1968), TODOROVIC et al (1975) e AJAYI et al (1978). Somente o grupo 4 apresentou valores mínimos para o volume globular aproximadamente 15 dias após o pico da parasitemia.

O percentual de redução do VG variando de 10,2 a 19,3, mostrou-se inferior aos valores encontrados por MACHADO (1950), KUTTLER (1966), KLAUS e JONES (1968), VELLINI et al (1969), ZARAZA e KUTTLER (1971), KUTTLER (1972), TODOROVIC e TELLEZ (1975), KUTTLER e JOHNSON (1977), GOFF et al (1985) e KOHAYAGAWA (1985). Este menor percentual de redução está, provavelmente relacionado a uma menor parasitemia atingida por estes animais à época em que foram instituídos os tratamentos.

Após desafio o percentual de redução do VG foi maior do que após a primeira inoculação. Resultados semelhantes a este foram obtidos por TODOROVIC e TELLEZ (1975), KUTTLER et al (1984) e PAYNE et al (1990). Esta maior redução após o desafio deve estar relacionada à existência de um processo auto-imune, como descrito por Ristic (1968) ou à amostra de *A. marginale* utilizada no desafio, como observado por KUTTLER et al (1984), que animais desafiados com amostras heterólogas apresentaram uma maior redução no VG do que aqueles desafiados com amostras homólogas.

5.4 - Temperatura retal

Observando os gráficos 11 a 15, nota-se uma diferença na temperatura retal mensurada no período da manhã e à tarde, em todos os grupos. Diferenças como esta foram verificadas por TODOROVIC et al (1975) e KOHAYAGAWA (1985) nas fases de parasitemia por *A. marginale*.

Outros autores (MACHADO, 1950, KUTTLER, 1966, RANALI et al, 1957), citam elevações da temperatura, acima de 39,5°C, na fase clínica da anaplasnose, sem, entretanto, se referirem ao período do dia em que eram feitas as mensurações.

AJAYI et al (1978) relatam a influência do nível nutricional na elevação da temperatura retal em bovinos após inoculação com *A. marginale*, sendo que animais que receberam baixos níveis nutricionais não apresentaram elevações de temperatura durante a fase de parasitemia do *A. marginale*. Neste trabalho, apesar dos animais receberem quantidades limitadas de ração, todos os grupos apresentaram elevações de temperatura na fase clínica da anaplasnose.

Os resultados deste trabalho demonstram ser a temperatura retal um dos parâmetros a serem observados durante a premunição, e que o nível estabelecido ($\geq 39,5^{\circ}\text{C}$), sozinho, não é um bom parâmetro para se estabelecer a instituição de tratamento pois, em todos os grupos estudados, temperaturas acima deste nível foram observadas, quase que exclusivamente, no período da tarde. As elevações de temperatura pela manhã, apesar de apresentarem menores valores, acompanharam aquelas verificadas à tarde.

5.5 - Sorologia para *A. marginale*

O perfil sorológico de todos os grupos foi semelhante, com um título máximo ocorrendo entre 20 a 30 dias após o pico da parasitemia, um declínio a partir da sétima semana após inoculação e novo crescimento após desafio. Estes resultados, em relação ao perfil sorológico, são semelhantes aos obtidos por MONTENEGRO-JAMES et al (1985), mas os títulos obtidos por eles após desafio foram bem mais elevados do que aqueles observados neste trabalho.

Os animais dos grupos 3 e 5, que receberam a inoculação de *A. marginale* somente 17 dias após a inoculação de *Babesia* spp., responderam mais precocemente à sorologia do que aqueles que receberam inoculações simultâneas. A inoculação simultânea de *Babesia* spp. e *A. marginale*, parece ter retardado o aparecimento de anticorpos contra *A. marginale* detectáveis à RIFI. Estes resultados merecem maiores investigações.

Reações positivas foram observadas 14 DAI em 3 animais e somente 28 DAI todos os animais apresentaram-se positivos, sendo estas observações semelhantes às verificadas por KROON et al (1990). Entretanto, estes autores observaram títulos de anticorpos $\geq 1:5120$ aos 14 DAI em 2 animais, em sua primeira sorologia positiva. Provavelmente esta diferença se deve ao fato de que estes animais foram inoculados com grande quantidade de sangue infectado, apresentando período prepatente de apenas 1 dia. Os resultados diferem também daqueles encontrados por WILSON et al (1978) que encontraram títulos positivos em bovinos inoculados com *A. marginale* a partir de 7 DAI.

Os títulos máximos ocorreram em média 42 a 49 DAI, sendo semelhante ao observado por KROON et al (1990) e diferindo do observado por GONZALES et al (1978), WILSON et al (1978) e MONTENEGRO-JAMES (1985) que observaram valores máximos 22, 29 e 35 DAI.

Não foi observada relação entre título de anticorpos e proteção contra *A. marginale* ao desafio. Esta observação está em concordância com o descrito por MURPHY et al (1966) , KLAUS e JONES (1968) e MONTENEGRO-JAMES (1985).

Vários autores (MURPHY et al 1966, KUTTLER, 1966, KLAUS e JONES, 1968, TODOROVIC et al, 1975, KUTTLER et al, 1984) utilizaram a RFC para descrever o perfil sorológico de animais inoculados com *A. marginale*. Os resultados obtidos por eles, às vezes diferem muito dos obtidos neste trabalho, não só por diferenças inerentes à técnica, mas também por trabalharem com classes de imunoglobulinas separadamente (IgM e IgG).

A RIFI tem sido amplamente utilizada em trabalhos de epidemiologia da anaplasnose e a sua comparação com outros métodos sorológicos de diagnóstico (WILSON et al 1978, GONZALES et al 1978, GOFF et al 1990, SHKAP et al, 1990) tem demonstrado ser esta técnica comparável em sensibilidade e acuidade com as demais , podendo, portanto, ser aplicada sem problemas em estudos de resposta sorológica.

6 - CONCLUSÕES

1 - Sangue infectado com *A. marginale* e conservado em nitrogênio líquido é uma opção viável e eficiente para obtenção de inóculo padronizado destinado à premunição.

2 - O inóculo para *A. marginale* foi eficiente para induzir infecção e o método utilizado para premunição mostrou-se eficiente para induzir proteção em todos os animais inoculados.

3 - O tratamento da anaplasnose em animais submetidos à premunição deve ser feito quando são observadas alterações clínicas em presença de parasitemia patente (1 a 3%).

4 - A duração do tratamento depende da remissão dos sinais clínicos.

5 - A parasitemia máxima ocorre durante o tratamento da anaplasnose.

6 - As reinfecções com *A. marginale* são frequentes após desafio de animais primoinfectados, mas os níveis de parasitemia são mais baixos e o número de tratamentos menor.

7 - Elevações da temperatura retal ocorrem durante a fase clínica da anaplasnose com valores mais elevados no período da tarde.

8 - O volume globular atinge níveis médios mais reduzidos três a sete dias após o pico de parasitemia por *A. marginale* e apresenta maior percentual de redução após o desafio.

9 - Os níveis mais elevados de anticorpos anti-*A. marginale* são observados 20 a 30 dias após o pico da parasitemia.



7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJAYI, S.A., WILSON, A.J., CAMPBELL, R.S.F. Experimental bovine anaplasmosis: clínico-pathological and nutritional studies. *Res. Vet. Sci.*, v.25, p. 76-81, 1978.

AKINBOADE, O.A., DIPEOLU, O.O. Comparison of blood smear and indirect fluorescent antibody techniques in detection of hemoparasite infections in trade cattle in Nigeria. *Vet. Parasitol.*, v.14, p.95-104, 1984.

BANGEL Jr., J.J., SCHEFFER, A.L., DIAS, M.M. Premunicação de bovinos segura e sem perdas. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.15/16, p.5-9, 1987/8.

BRASIL, A.G. Premunicação contra a tristeza parasitária em bovinos a campo. *Hora Vet.*, v.2, n.10, p.4-8, 1982.

CARSON, C.A., SELLS, D.M., RISTIC, M. Cell-mediated immunity related to challenge exposure of cattle inoculated with virulent and attenuated strains of *Anaplasma marginale*. *Am. J. Vet. Res.*, v.38, n.8, p.1167-72, 1977.

FAN, L.C.R., SANTOS, L.T., SUSKO, I., FLORES, M.L. Resposta dos reticulócitos em bovinos da raça Charolesa submetidos à premunicação. *Rev. Centro Ciências Rur.*, v.10, n.3, p.267-70, 1980.

GOFF, W.L., JOHNSON, W.C., KUTTLER, K.L. Development of an indirect fluorescent antibody test, using microfluorometry as a diagnostic test for bovine anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.46, n.5, p.1080-84, 1985.

- GOFF,W.L., STILLER,D., ROEDER,R.A., JOHNSON,L.W., FALK,D., GORHAM,J.R., MCGUIRRE,T.C. Comparison of a DNA probe, complement-fixation and indirect immunofluorescence test for diagnosing *Anaplasma marginale* in suspected carrier cattle. *Vet. Microbiol.*, v.24, n.3/4, p.380-90, 1990.
- GONZALES,E.F., LON,R.F., TODOROVIC,R.A. Comparisons of the complement-fixation, indirect fluorescent antibody and card agglutination tests for the diagnosis of bovine anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.39, n.9, p.1538-41, 1978.
- IICA. Tecnicas para el diagnostico de babesiosis y anaplasmosis bovinas. 79p. San Jose, Costa Rica, 1987.
- JAMES,M.A., CORONADO,A., LOPES,W., MELENDEZ,R., RISTIC,M. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v.17, p.9-18,1985.
- KLAUS,G.G., JONES,E.W. The immunoglobuline response in intact and splenectomized calves infected with *Anaplasma marginale*. *J. Immunol.*, v.100, n.5, p.991-99, 1968.
- KOHAYAGAWA,A. Estudo clínico e laboratorial do desenvolvimento da premunição contra *Babesia* e *Anaplasma* em bovinos (*Bos taurus*) da raça Fleckvieh. Botucatu, 1985, 117p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária).
- KROON,J.F.E.M., PERIE,N.M., FRANSSEN,F.F.J., UILENBERG,G. The indirect fluorescent antibody test for bovine anaplasmosis. *Vet. Quart.*, v.12, n.2, p.124-28, 1990.
- KUTTLER,K.L. Clinical and hematologic comparison of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.27, n.119, p.941-46, 1966.
- KUTTLER,K.L. Comparative response to premunization using attenuated *Anaplasma marginale*, virulent *A. marginale* and *A. centrale* in different age groups. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, v.4, n.4, p.197-203, 1972.
- KUTTLER,K.L., JOHNSON,L.W. *Anaplasma* and *Babesia* premunition of 2 year old Holstein heifers destined for shipment to Nicaragua. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, v.72, n.8, p.1354-59, 1977.



- KUTTLER, K.L., ZAUGG, J.L., JOHNSON, L.W. Serologic and clinical responses of previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. *Am. J. Vet. Res.*, v.45, n.11, p.2223-26, 1984.
- LIMA, J.D. Premunção: uma alternativa para o controle da tristeza parasitária. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. 7. São Paulo, 22-26 de setembro, 1991. *Anais...* p.39-43, 156p., São Paulo, 1991.
- MACHADO, A.V. Estudo preliminar sobre a ocorrência de reticulócitos na anaplasmose e piroplasmose. *Arq. Es. Sup. Vet. UREMIG*, v.3, p.35-46, 1950.
- MONTENEGRO-JAMES, S., JAMES, M.A., RISTIC, M. Modified indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.46, n.11, p.2401-03, 1985.
- MURPHY, F.A., OSEBOLD, J.W., AALUND, O. Kinetics of the antibody response to *Anaplasma marginale* infection. *J. Infect. Dis.*, v.116, n.1, p.99-111, 1966.
- PAYNE, R.C., OSORIO, O., YBANEZ, A. Tick borne diseases of cattle in Paraguay. II. Immunization against anaplasmosis and babesiosis. *Trop. Anim. Hlth Prod*, v.22, n.2, p.101-8, 1990.
- RANALI, E., GONZALES, G.S., KOERBER, W.L. Premunção e terapêutica das plasmoses bovinas. *Bol. Ind. Anim.*, v.16, p.197-208, 1957.
- RISTIC, M. Anaplasmosis. In: WEINMAN, D., RISTIC, M. *Infectious blood diseases of man and animals*. New York & London. Academic Press, 1968. V.II, p.473-543.
- RISTIC, M. Bovine anaplasmosis. In: KREIER, J.P. *Parasitic protozoa*. New York & London. Academic Press, 1977. V. IV, p.235-49.
- SERGEANT, E., PARROT, L., DONATIEN, A. "Une question de terminologie: Immuniser et premunir." *Bull. Soc. Path. Exot.*, v.17, p.37-38, 1924.
- SHKAP, V., BIN, H., UNGAR-WARON, H., PIPANO, E. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. *Vet. Microbiol.*, v.25, n.1, p.45-53, 1990.

- SILVA, B.B., RANALI, E. "Tristeza" bovina - babesioses e anplasmoses -
premunição - progressos na terapêutica da "tristeza". *O Biológico*,
v.23, p.167-80, 1957.
- STEPHAN, O., ESQUIBEL, A. Método de premunicação contra a "tristeza", usado no
Posto Zootécnico de São Paulo. *Arq. Inst. biol. S. Paulo*, v.2, p.183-
208, 1929.
- THEILER, A. *Anaplasma marginale* (genus nov. et sp. nov.) un nouveaux
protozoaire du bétail. *Bull. Soc. Path. Exot.*, v.3, n.63, p.135, 1910.
- TODOROVIC, R.A., GONZALEZ, E.F., ADAMS, L.G. *Babesia bigemina*, *Babesia*
argentina, and *Anaplasma marginale*: coinfectious immunity in bovines.
Exp. Parasitol., v.37, p.179-92, 1975.
- TODOROVIC, R.A., TELLEZ, C.H. The premunition of adult cattle against
babesiosis and anaplasmosis in Colombia, South America. *Trop. Anim.*
Hlth Prod., v.7, n.3, p.125-31, 1975.
- VELLINI, L.L., RANALI, A., COLOMBO, M., HOXTER, G. Pesquisa eletroforética-
hematológica-clínica de bovinos submetidos à premunicação contra
piroplasmose (*Piroplasma bigeminum*) e a anaplasmosse (*Anaplasma*
marginale) no estado de São Paulo. *Bol. Ind. Anim.*, v.26, p.349-55,
1969.
- WILSON, A.J., TRUEMAN, K.F., SPINKS, G., McSORLEY, A.F. A comparison of 4
serological tests in the detection of humoral antibodies to
anaplasmosis in cattle. *Aust. Vet. J.*, v.54, n.8, p.383-86, 1978.
- ZARAZA, H., KUTTLER, K.L. Comparative efficacy of different immunization
systems against anaplasmosis. *Trop. Anim. hlth Prod.*, v.3, n.2, p.77-
82, 1971.