

Pedro Veloso Facury Lasmar

Avaliação clínica e parasitológica de animais inoculados com vacinas inativadas de  
*Anaplasma marginale* e desafiados experimentalmente

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

Área de Concentração: Clínica e Cirurgia  
Veterinárias

Orientador: Antônio Último de Carvalho

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2010

L345a Lasmal, Pedro Veloso Facury, 1982-  
Avaliação clínica e parasitológica de animais inoculados com vacinas inativadas de *Anaplasma marginale* e desafiados experimentalmente / Pedro Veloso Facury Lasmal. – 2010.

60 p. : il.

Orientador: Antônio Último de Carvalho

Co-orientador: Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Bezerra – Doenças – Teses. 2. Bezerra – Estudos experimentais – Teses.  
3. Anaplasmosse – Vacina – Teses. 4. Parasitologia veterinária – Teses. I. Carvalho,  
Antônio Último de. II. Ribeiro, Múcio Flávio Barbosa. III. Universidade Federal de Minas  
Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.208 969

Dissertação defendida e aprovada em 23 de Agosto de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. António Último de Carvalho  
Orientador



Prof. Camila de Valgas e Bastos



Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro



## Agradecimentos

Agradeço a Deus por me dar forças e coragem para a realização de meus sonhos, sem ele ao meu ou ao seu lado caro leitor, nada disso seria possível. Com Deus em nossas vidas, tudo podemos e tudo fazemos, não temos limites e nada se torna tão impossível a ponto de não poder ser realizado ou executado. Após este agradecimento a Deus, também quero agradecer as outras pessoas que estão morando lá no céu e com certeza estão perto dele também, um abraço todo carinhoso e um beijo enorme aos meus avós, Ronan e Helena que mesmo estando longe nunca me abandonaram e estão sempre ao meu lado, iluminando meus passos. Obrigado meu PAPAI e minha MAMÃE por não desistirem de me ajudar e por terem confiado em mim quando decidi parar de trabalhar e me dedicar aos estudos novamente. Sei que foi difícil para vocês também, mas com força e fé superamos tudo e todos e acabou dando certo, Pai e Mãe, perto ou longe amo vocês de coração e agradeço pelos ensinamentos e a educação que para mim foi passada, acho que aprendi! Saudade. Agradeço também aos meus três mosqueteiros, Ronildes, Lukete e Paty, pela ajuda, acolhimento e paciência quando então este pobre garoto chegava em casa com um cheiro lamentável de curral, obrigado por não me expulsarem do meu quarto. A vocês três um abraço enorme e como nosso sangue é o mesmo, carregue comigo a benção e a companhia de vocês por onde eu for. Um beijo enorme e meu eterno obrigado a minha Princesinha Fernandinha que ao meu lado passou maus bocados, mas com o amor que sentimos um pelo outro superamos tudo, TE AMO. Junto a ti meu amor, agradeço a teus pais Wagner e Léa e a teus irmãos Rodrigo, Suellen e Karina pela confiança e amizade. Tia Aparecida, Tio Geraldo muito obrigado pelo apoio nas horas difíceis que se você tia não lembra começou ainda na graduação, quando me ajudava a pagar o transporte para a faculdade, e um dia falei que te pagava, mas até hoje não paguei, quem sabe um dia né, paciência que este dia chega, valeu mesmo tia, muito obrigado e serei eternamente grato pela ajuda. Vó Fia, Tia Zany e Tio Pezão, Parda, Netto, Tia Eneida e Tio Breno, obrigado pela atenção e pelo apoio quando precisei e pelos três anos que passamos juntos, vocês são especiais e a melhor família que alguém poderia ter. Aos estagiários que me auxiliaram em minha caminhada, meu muito obrigado, Aos funcionários da escola, Luís, Waguinho, Côco, Adão valeu pela ajuda nunca esquecerei. As meninas da limpeza, muito obrigado pelo acolhimento e pelos cafezinhos, principalmente por aquele do dia 1 de janeiro. Juntinha de boi Marrento e Mormaço, LÉLÉ, Lú e Laizinha valeu pela amizade e pela força durante estes 10 meses, espero que posso ter contribuído um pouco para a formação de vocês. Pessoal do laboratório: Julinha. Camila, Brima e Mercês, valeu, foi ótimo conhecer vocês. Lobão, Professor Último e Múcio, acharam que tinha esquecido de vocês né! Não tem como, agradeço a Deus todos os dias por ter colocado pessoas assim como vocês no meu caminho e que possibilitarão a minha caminhada. Mais que doutores e professores de Clínica de Ruminantes e de Parasitologia vocês são mestres da vida e feliz de quem como eu fui, ter a oportunidade de conhecê-los e de serem seus amigos, continuem ensinando sobre a vida desse jeito alegre que encanta a todos por onde passam e saibam que nunca esquecerei das ótimas pessoas que são e o que me foi passado e a confiança em mim depositada, O PESO FOI GRANDE, A VIAJEM FOI LONGA, OS OBSTÁCULOS FORAM DESAFIADORES MAS TODOS NÓS CONSEGUIMOS ALCANÇAR O OBJETIVO FINAL, não somente a conclusão de um trabalho mas também um ciclo de amizade inigualável e inquebrável. Professores tenho a maior admiração por vocês, hoje sou uma pessoa feliz, e com novos conceitos sobre a vida, abraço a todos que me ajudaram e como a vida de um pesquisador e sempre descobrir, finalmente encontrei o significado da palavra SAUDADE.

Se me perguntarem após tudo que passei se toparia um novo desafio como este, com o coração aberto e o peito cheio de alegria, com entusiasmo de um menino de 10 anos que acabara de ganhar a primeira bicicleta, viraria para vocês e responderia, COM UMA EQUIPE DESTA AO MEU LADO POR QUE NÃO? Paciência, já já estaremos trabalhando junto de novo. Um abraço e meu muito obrigado DE CORAÇÃO a todos que me ajudaram nesta jornada. Pedrinho.



---

## SUMÁRIO

---

Lista de tabelas.....	8	
Lista de figuras.....	9	
Lista de abreviaturas.....	13	
Resumo.....	14	
Abstract.....	14	
1	Introdução.....	15
2	Revisão Bibliográfica.....	16
2.1	Histórico da anaplasmosose.....	16
2.2	Ciclo da anaplasmosose bovina.....	17
2.3	Características da doença.....	18
2.4	Sinais clínicos e alterações metabólicas.....	18
2.5	Resposta imune na infecção por <i>Anaplasma marginale</i> .....	21
2.5.1	Caracterização da resposta imune dos ruminantes.....	21
2.5.2	Soroconversão.....	21
2.5.3	Resposta imune na infecção por <i>Anaplasma marginale</i> .....	21
2.6	Vacinas contra <i>Anaplasma marginale</i> .....	25
2.6.1	Vacinas vivas de <i>Anaplasma marginale</i> .....	25
2.6.2	Vacinas inativadas de <i>Anaplasma marginale</i> .....	26
3	Material e Métodos.....	28
3.1	Local e período.....	28
3.2	Criação dos animais.....	28
3.3	Preparo das vacinas de <i>Anaplasma marginale</i> .....	30
3.4	Grupos experimentais.....	30
3.5	Monitoramento dos grupos experimentais.....	31
3.5.1	Exame clínico.....	31
3.5.2	Avaliação da imunidade humoral.....	31
3.5.3	Avaliação da parasitemia.....	31
3.5.4	Avaliação do hematócrito.....	32
3.5.5	Tratamento dos animais.....	32
4	Análise estatística.....	32
5	Resultados e discussão.....	33
5.1	Soroconversão.....	33
5.2	Período de incubação, período de patência e período de convalescença....	34
5.3	Avaliação da parasitemia.....	36
5.3.1	Esfregaço de sangue.....	36
5.3.2	Citometria de Fluxo.....	37
5.4	Hematócrito.....	39
5.5	Parâmetros clínicos.....	43
5.5.1	Frequência cardíaca e respiratória.....	43
5.5.2	Temperatura retal.....	46
5.6	Correlação.....	48
6	Considerações finais.....	49
7	Conclusão.....	49
8	Referências Bibliográficas.....	50
9	Anexos.....	56

---

---

**LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1	Grupos experimentais e tratamentos.....	31
Tabela 2	Experimentos com vacinas de <i>Anaplasma marginale</i> cultivadas em células de carrapato IDE8, em relação a idade dos animais, número de doses e intervalos entre elas, tamanho do desafio e cepa utilizada, assim como o tempo para desafio após a última dose da vacina .....	34
Tabela 3	Valores em dias do período de incubação (PI) <sup>1</sup> , período de patência (PP) e período de convalescença (PC), em função do desafio de bezerros com corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> (3 x 10 <sup>5</sup> ), cepa UFMG2, nos tratamentos, após protocolo de vacinação .....	34
Tabela 4	Valores do percentual de parasitemia medida através de esfregaço de sangue em função dos dias e dos tratamentos de bezerros desafiados com corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> (3 x 10 <sup>5</sup> ), cepa UFMG2, após protocolo de vacinação .....	37
Tabela 5-	Valores do percentual de parasitemia medida por citometria de fluxo em função dos dias e dos tratamentos de bezerros desafiados com corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> (3 x 10 <sup>5</sup> ), cepa UFMG2, após protocolo de vacinação .....	38
Tabela 6	Valores do hematócrito em função dos dias e dos tratamentos de bezerros desafiados com corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> (3 x 10 <sup>5</sup> ), cepa UFMG2, após protocolo de vacinação .....	40
Tabela 7	Valores da frequência cardíaca em função dos dias e dos tratamentos de bezerros desafiados com corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> (3 x 10 <sup>5</sup> ), cepa UFMG2, após protocolo de vacinação .....	43
Tabela 8	Valores da frequência respiratória medida através de esfregaços de sangue em função dos dias e dos tratamentos de bezerros desafiados com corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> (3 x 10 <sup>5</sup> ), cepa UFMG2, após protocolo de vacinação .....	45
Tabela 9	Valores da temperatura retal em função dos dias e dos tratamentos de bezerros desafiados com corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> (3 X 10 <sup>5</sup> ), cepa UFMG2, após protocolo de vacinação .....	48
Tabela 10	Correlação das variáveis (frequência cardíaca, frequência respiratória, hematócrito, esfregaço de sangue e citometria de fluxo) de bezerros desafiados experimentalmente com corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> (3 x 10 <sup>5</sup> ), cepa UFMG2, do dia 27 ao 38 após inoculação.....	60

---



---

**LISTA DE FIGURAS**

---

Figura 1	Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento do <i>Anaplasma marginale</i> em bovinos e carrapatos .....	17
Figura 2	Microscopia eletrônica das formas reticuladas dividindo-se por fissão binária do <i>Anaplasma marginale</i> em colônias de células infectadas de carrapatos.....	18
Figura 3	Esquema da resposta imune na anaplasmose.....	23
Figura 4	Via do sistema da cascata de complemento.....	24
Figura 5	Instalações da Clínica de Ruminantes do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária da UFMG.....	29
Figura 6A	Acomodações dos animais no galpão da Escola de Veterinária de UFMG. Baias com cama de serragem.....	30
Figura 6B	Acomodações dos animais no galpão da Escola de Veterinária de UFMG. Baias individuais com cama de borracha (sistema tie stall) .....	30
Figura 7	Linha do tempo relativa aos dias de vacinação, desafio e monitoramento dos animais .....	35
Figura 8	Comportamento dos valores médios da parasitemia medida por esfregaço de sangue na anaplasmose, induzida pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade.(Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Belo Horizonte, 2010 .....	37
Figura 9	Comportamento dos valores médios da parasitemia medida por citometria de fluxo na anaplasmose, induzida pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ), cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade. (Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Belo Horizonte, 2010 .....	38
Figura 10	Comportamento dos valores médios do hematócrito na anaplasmose, induzida pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ), cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade. (Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Belo Horizonte, 2010 .....	41
Figura 11	Análise de regressão do comportamento do hematócrito em relação ao tempo, durante períodos de patência e convalescença da anaplasmose em bezerros (n=20) com 6 meses de idade, infectados experimentalmente com inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ), cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Belo horizonte, 2010 .....	41

Figura 12	Comportamento dos valores do hematócrito e da parasitemia na anaplasnose, em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Belo Horizonte, 2010.....	42
Figura 13	Comportamento dos valores médios da frequência cardíaca na anaplasnose, induzida pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade. (Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Belo Horizonte, 2010.....	44
Figura 14	Comportamento dos valores da frequência cardíaca e do hematócrito na anaplasnose, em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Belo Horizonte, 2010.....	44
Figura 15	Comportamento dos valores médios da frequência respiratória na anaplasnose, induzida pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade. (Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Belo Horizonte, 2010.....	45
Figura 16	Comportamento dos valores da frequência respiratória do hematócrito na anaplasnose, em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Belo Horizonte, 2010.....	46

Figura 17	Comportamento dos valores médios da temperatura retal na anaplasnose, induzida pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade. (Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Belo horizonte, 2010 .....	47
Figura 18	Comportamento dos valores da temperatura retal e da parasitemia na anaplasnose, em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Belo Horizonte, 2010 .....	48
Figura 19	Comportamento dos valores da frequência cardíaca e da parasitemia na anaplasnose, em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Belo Horizonte, 2010 .....	56
Figura 20	Comportamento dos valores médios da frequência respiratória e da parasitemia na anaplasnose, induzida pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade. (Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Belo Horizonte, 2010 .....	57
Figura 21	Comportamento dos valores da temperatura retal e da frequência cardíaca na anaplasnose, em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Belo Horizonte, 2010 .....	58

Figura 22	Comportamento dos valores médios da temperatura retal e da frequência respiratória na anaplasmose, induzida pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade. (Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Belo horizonte, 2010 .....	59
Figura 23	Comportamento dos valores médios da temperatura retal e do hematócrito na anaplasmose, induzida pela inoculação de corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade. (Grupo 1: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Belo horizonte, 2010 .....	60

---

---

### LISTA DE ABREVIATURAS

AHA	Anemia Hemolítica Autoimune
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
Bmp	Batimentos por Minuto
BPL	$\beta$ -propilactone
CO <sub>2</sub>	Gás Carbônico
CTF	Caldo de Triptose Fosfatada
CV	Coefficiente de variação
DAF-BE	Diacetato de Fluoresceína-Brometo de Etídio
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAB	Fragmento de Ligação aos Antígenos
FC	Frequência Cardíaca
Fc	Porção responsável por interagir com as moléculas e células efectoras
FR	Frequência Respiratória
H <sup>+</sup>	Hidrogênio
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Ácido Carbônico
H <sub>2</sub> O	Água
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Íon Carbonato (Bicarbonato)
HPB	Holandês Preto e Branco
HT	Hematócrito
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
INF – $\gamma$	Interferon Gama
K <sup>+</sup>	Potássio
L-15B	Meio Leibovitz
LBC	Lipoproteína Bovina Concentrada
LPS	Lipopolissacárides
MHC – I	Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe I
MHC – II	Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe II
mL	Mililitros
Mrm	Movimentos Respiratórios por minuto
MSP	Proteínas Principais de Superfícies
NK	Células Natural Killer
PAMP	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Período de Convalescença
PI	Período de Incubação
PP	Período de Patência
Rpm	Rotações por Minuto
SFB	Soro fetal Bovino
TGF – $\beta$	Fator de Crescimento Tumoral Beta
TH – 1	Linfócitos T-helpers
TLR	Receptores de Membrana
TNF – $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TR	Temperatura Retal
VCM	Volume Corpuscular Médio
VG	Volume Globular
WBC	Células Brancas Sanguíneas

---

## RESUMO

No presente trabalho, foram avaliadas vacinas inativadas de *Anaplasma marginale* (vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso, vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante) e vacina com sobrenadante da cultura + saponina) juntamente com um grupo controle (solução salina + solução oleosa) em 20 bezerros Holandeses (HPB) com seis meses de idade, frente a desafio experimental com  $3 \times 10^5$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* cepa UFMG2 (amostra sem apêndice, considerada de alta patogenicidade). O método utilizado para a avaliação destas vacinas foram soroconversão, período de incubação (PI), período de patência (PP) e período de convalescença (PC). Durante estes períodos foram avaliados os seguintes parâmetros clínicos: frequências cardíacas e respiratórias, temperatura retal, volume globular e parasitemia (esfregaço de sangue e citometria de fluxo), assim como a correlação entre estas variáveis. Não ocorreu diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos em relação ao PI, PP e PC assim como nos parâmetros clínicos.

Palavras chave: Anaplasmosse, vacina, parasitemia, hematócrito, anemia, comportamento.

## ABSTRACT

In the present work, inactivated vaccines of *Anaplasma marginale* were valued (vaccine containing  $3 \times 10^9$  corpuscles of *Anaplasma marginale* + oil adjuvante, vaccine containing  $3 \times 10^9$  corpuscles of *Anaplasma marginale* + culture supernatant and saponin as an adjuvant and vaccinates with culture supernatant + saponin together with a control group (saline solution + oil solution) in 20 calves (HPB) with six months of age, in front of experimental challenge with  $3 \times 10^5$  corpuscles of *Anaplasma marginale* sample UFMG2 (sample without appendix, thought of rise pathogenicity). The method used for the evaluation of these vaccines they were soroconvesion, incubation period (PI), patent period (PP) and period of convalescence (PC). During these periods the next clinical parameters were valued: cardiac and respiratory frequencies, retal temperature, rounded volume and parasitemia (smear of blood and flow cytometry), as well as the correlation between these variables. There did not take place significant difference ( $p > 0,05$ ) between the groups regarding the PI, PP and PC as well as in the clinical parameters.

Key words: Anaplasmosis, vaccine, parasitemia, hematocrit, anaemia, behaviour

## 1. INTRODUÇÃO

A anaplasmosse bovina constitui um dos fatores sanitários limitantes para a produção pecuária mundial. Os prejuízos determinados por *Anaplasma* spp. e por outros hemoparasitas, como *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* no Brasil, foram estimados em R\$ 500 milhões/ano (Barros et al., 2005), sendo a anaplasmosse uma das principais causas de mortalidade de bezerros no país (Ribeiro et al., 1983; Madruga et al., 1984).

O *Anaplasma marginale* encontra-se distribuído por todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta sendo considerada endêmica em vários países da América Central e do Sul além do Caribe, com exceção a áreas de deserto e elevadas altitudes como os Andes (Guglielmone, 1995). Nos Estados Unidos, *A. marginale* é enzoótica em vários estados do sudeste, ao longo da costa do Atlântico e estados da região oeste, levando a uma perda econômica na ordem de US\$ 800 a 875 milhões/ ano (Kocan et al. 2003).

Foram descritos relatos da bactéria em países europeus às margens do Mediterrâneo (Kocan et al., 2000), Oriente Médio e Ásia (Molad et al., 2006), além do continente africano onde foi inicialmente estudada (Theiler, 1910). Bovinos infectados por *A. marginale* tem sido encontrados na Áustria (Baumgartner et al., 1993), Itália, Espanha, Portugal, e alguns países do leste europeu (Kocan et al., 2003).

No Brasil, existem áreas de instabilidade enzoótica como o Sertão do Sergipe (Oliveira et al., 1992) e o extremo sul do Rio Grande do Sul (Artiles et al., 1995). Nessas áreas, os fatores ecológicos e climáticos não favorecem o desenvolvimento do *Boophilus microplus* e de dípteros hematófagos transmissores de *Anaplasma marginale* em determinadas estações do ano.

Áreas de estabilidade enzoótica como Minas Gerais, também são encontradas no Brasil, onde Ribeiro et al. (1995) determinaram a prevalência de anaplasmosse para quatro regiões deste estado, sendo elas: Alto Paranaíba, 86,5%, Zona Metalúrgica, 93,7%, Sul de Minas, 91,6% e Triângulo Mineiro, 86,4%. Souza et al. (2000) e Souza et al. (2001) observaram a prevalência de 91,16% e 98,21% de anticorpos contra *A. marginale* em bovinos das mesorregiões Norte Fluminense e do Médio Paraíba, estado do Rio de Janeiro, respectivamente, regiões também consideradas de estabilidade enzoótica. No estado da Bahia, nos municípios de Senhor do Bonfim e Euclides da Cunha, Barros et al.(2005) encontraram uma prevalência de 97 e 94,8% respectivamente.

Em áreas endêmicas para anaplasmosse, as medidas de controle adotadas não visam impedir a infecção e sim reduzir a ocorrência de casos clínicos e a mortalidade de animais decorrentes da intensa ricketsemia e conseqüente queda do volume globular (VG) provocada pelo *A. marginale* (Ribeiro e Lima, 1996).

Os métodos utilizados para o controle da anaplasmosse como a premunicação, juntamente com a quimioprofilaxia não são confiáveis, pois, além de exigir um monitoramento minucioso, não se tem certeza da quantidade de corpúsculos inoculados, podendo ou não desenvolver doença clínica ou infecção concomitante com outros agentes (Camarillo et al., 1999). A vacinação tem sido um meio economicamente viável e eficaz para o controle da anaplasmosse visto que, o método de premunicação apresenta falhas. As vacinas utilizadas podem ser vivas com espécies atenuadas ou inativadas, sendo as vacinas vivas mais indicadas para animais jovens, uma vez que estes possuem certa imunidade contra *Anaplasma marginale*. Para animais adultos o indicado são as vacinas inativadas,

pois estas apresentam um menor risco para esta faixa etária (Kocan et al., 2003).

O inóculo vivo para controle da anaplasmosse bovina existente no mercado brasileiro utiliza amostras de *Anaplasma centrale* (Arteche, 1992). Entretanto, sabe-se que amostras heterólogas de *Anaplasma* sp. não conferem níveis de imunidade suficientes para prevenir o desafio com amostras virulentas de campo de *Anaplasma marginale* (Potgieter e Van Rensburg, 1983; Payne et al., 1990). A utilização de amostras homólogas tem sido descrita na literatura como eficiente. Atualmente seu uso restringe-se a poucas propriedades, devido à ausência de tais inóculos no mercado e aos altos custos para sua produção e manutenção (Kessler et al., 1998). Ribeiro et al. (1997) descreveram, pela primeira vez, um isolado de *A. marginale* com apêndice, amostra considerada de baixa patogenicidade. Desde então, esta cepa, nomeada UFMG1, tem sido utilizada como amostra homóloga nas pesquisas desenvolvidas por estes autores.

Para a produção de vacinas vivas, animais esplenectomizados são criados livres de carrapatos, inoculados experimentalmente com cepas de *A. marginale* e utilizados como doadores. Entretanto, a transmissão de outros hemoparasitos por estes animais é sempre um risco neste método (Kocan et al., 2010).

Com o avanço das técnicas laboratoriais de purificação de antígenos com eliminação dos componentes das hemácias, as vacinas inativadas surgem com potencial promissor e vários estudos têm demonstrado indução de boa proteção contra desafio homólogo e proteção parcial com desafios heterólogos (Henry et al., 1983; Hart et al., 1987; Palmer et al., 1986; Montenegro et al., 1991; Blouin et al., 1998; Camarillo et al., 1999; Rodríguez et al., 2000; de la Fuente et al., 2002a).

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Avaliar vacinas inativadas com cepas UFMG1 e UFMG2 de *A. marginale* cultivadas em células embrionárias de carrapato *Ixodes scapularis* IDE8 em animais desafiados experimentalmente com UFMG2.
- 2) Avaliar os aspectos clínicos e comportamentais da anaplasmosse.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Histórico da anaplasmosse

O gênero *Anaplasma* foi criado em 1910 por Sir Arnold Theiler, que foi quem primeiramente reconheceu que os “pontos marginais”, encontrados em eritrócitos corados de animais doentes, eram os causadores de uma doença específica (Theiler, 1910). Kocan et al. (2010) relatam que Theiler denominou a espécie *Anaplasma marginale* a partir de sua estação de pesquisa na África do Sul, considerando-a um protozoário.

As inclusões marginalmente localizadas eram vistas frequentemente nas células vermelhas do sangue de bovinos anêmicos, muitas vezes naqueles que sofriam de babesiose (piroplasmose). Smith e Kilborne (1923), em sua clássica publicação sobre carrapatos como vetores da febre do Gado do Texas (publicado no boletim número 1 do Departamento da Secretaria de Agricultura e da Indústria Animal dos Estados Unidos), concluíram por engano que os pontos marginais faziam parte do ciclo de vida da *Babesia bigemina*. Theiler conseguiu isolar os dois agentes (*B. bigemina* e *A. marginale*) e reproduzir a “puro-infecção” com *Anaplasma marginale* e, corretamente, considerou que a babesiose e anaplasmosse eram duas doenças distintas e que muitas vezes coexistiam no mesmo animal.

Com várias publicações sobre anaplasmosse em 1910-1911, Theiler deixou claro que alguns dos animais com os quais Smith e



Kilborne tinham trabalhado foram duplamente infectados com babesia e anaplasma. Na seqüência dos trabalhos de Theiler, a anaplasmoze logo foi reconhecida nas regiões tropicais, subtropicais e em muitas zonas temperadas em todo o velho mundo. No entanto, apenas em 1926 a anaplasmoze, que ocorria concomitantemente com a febre do Gado do Texas (babesiose/piroplasmose), foi reconhecida nos Estados Unidos. Concluiu-se que o quadro de doença febril apresentado pelo gado do “Sudeste do Kansas”, geralmente ocorrendo no verão e no outono, tratava-se da mesma doença que Theiler tinha denominado de doença biliar ou anaplasmoze. (Darlington, 1926).

## 2.2. Ciclo da anaplasmoze bovina

De acordo com o ciclo apresentado na figura 1, os eritrócitos infectados são ingeridos durante a alimentação do carrapato *Dermacentor* spp, *Rhipicephalus* spp. Após a ingestão dos eritrócitos infectados, o primeiro sítio de infecção do *A. marginale* nos carrapatos são as células intestinais. Posteriormente o *A. marginale* coloniza outros tecidos do carrapato, incluindo as células das glândulas salivares, de onde a rickettsia é transmitida de volta para os bovinos (Kocan., 1986; Kocan et al., 1992a; Kocan et al., 1992b; Ge et al., 1996).

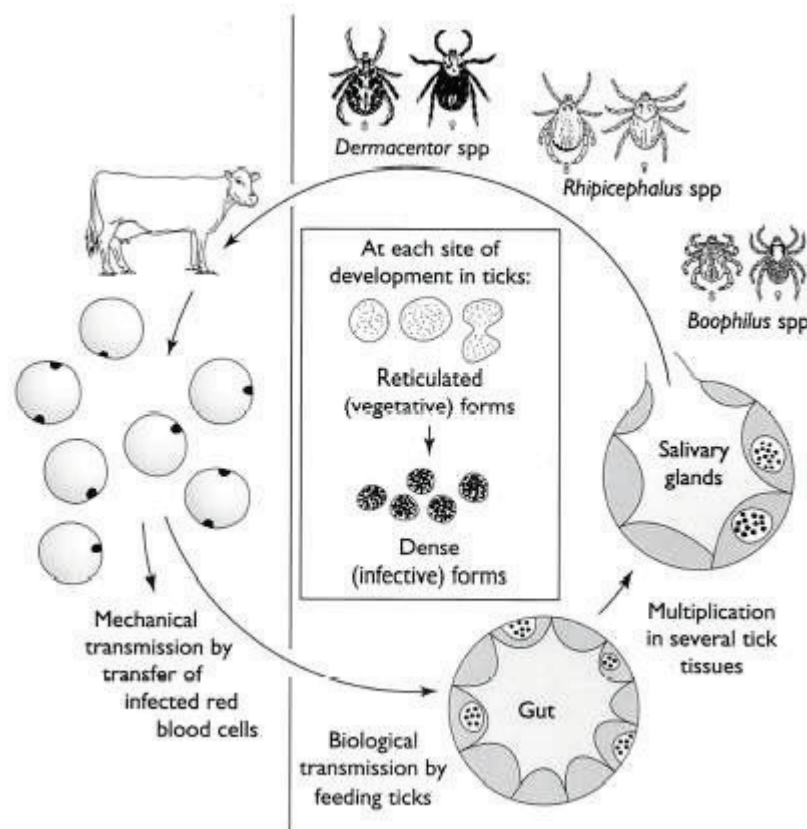


Figura 1. Desenho esquemático do ciclo de desenvolvimento do *Anaplasma marginale* em bovinos e carrapatos.

Fonte: Kocan et al. (2003)

Duas formas de *A. marginale* são encontradas nas células de carrapatos infectados, a forma reticulada e a forma densa. Inicialmente, aparecem as formas reticuladas na forma vegetativa que se divide por fissão binária (figura 2A)

formando grandes colônias que podem conter centenas de organismos. Em seguida, a forma reticulada passa para a forma densa, que é a forma infectante e imunogênica (figura 2B) (Palmer et al., 1999).

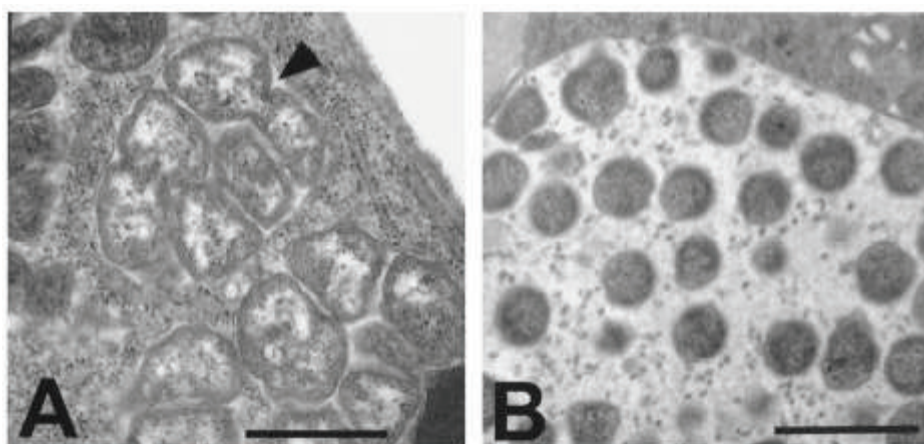


Figura 2. Microscopia eletrônica das duas fases de desenvolvimento do *Anaplasma marginale* em colônias de células infectadas de carrapatos. (A) formas reticuladas dividindo-se por fissão binária. (B) formas densas.

Fonte: Palmer et al. (1999)

### 2.3. Características da doença

A anaplasmosose bovina é uma enfermidade que acomete os ruminantes, causada pela rickettsia *Anaplasma marginale*, um microorganismo pertencente à ordem *Rickettsiales*, família *Anaplasmataceae* (Dumler et al., 2001).

O período de incubação da doença é de 28 dias em média, variando de sete a sessenta dias dependendo do número de organismos da dose infectante (Kocan et al., 2003).

Bezerros recém nascidos são mais resistentes a doença e quando infectados apresentam sinais clínicos moderados. Animais que se recuperam da fase aguda da doença perdem em média 86 kg (Palmer et al., 1986) e desenvolvem uma infecção persistente caracterizada por uma

ricketsemia baixa e cíclica (Ribeiro e Reis, 1981; Eriks et al., 1989; Kieser et al., 1990). Esses animais, também chamados de portadores, desenvolvem imunidade e resistência à doença clínica em caso de exposição ao agente homólogo (Ristic, 1960; Coelho, 2007). Entretanto, tornam-se fontes de infecção para os vetores (Ristic, 1960; Eriks et al., 1989) e também podendo transmitir transplacentariamente (Passos e Lima., 1984; Ribeiro et al., 1996).

### 2.4. Sinais clínicos e alterações metabólicas

As síndromes clínicas da anaplasmosose podem ser divididas em super-aguda, aguda e crônica. Na doença aguda, os sinais clínicos mais frequentes são a febre, inapetência, palidez de mucosas, fraqueza, constipação, sangue hidrêmico e

ocasionalmente icterícia (Coelho, 2007). O desenvolvimento das síndromes ocorre em quatro estágios: período de incubação, período patente, convalescença e estado portador. A severidade dos sinais clínicos é dependente da susceptibilidade do animal e, embora todas as idades sejam susceptíveis à infecção, as síndromes são mais severas em animais adultos. A doença apresenta-se moderada em animais jovens tornando-se progressivamente mais severa com o avançar da idade, apresentando-se superaguda a fatal em bovinos com mais de três anos de idade. A severidade está diretamente relacionada ao nível e a duração da parasitemia, que por sua vez está relacionada à taxa de multiplicação do microrganismo e à habilidade do hospedeiro em controlar a infecção através de sua resposta imune (Losos, 1986).

As células parasitadas são removidas da circulação pelo sistema monocítico fagocitário do animal (Richey, 1981) causando uma anemia de banda a grave e icterícia (Coelho, 2007). A anemia é classificada de acordo com o volume corpuscular médio (VCM) sendo inicialmente normocítica (VCM dentro dos limites de referência para a espécie; sugere, na anemia, que a eritropoiese não é efetiva), progredindo para macrocítica (VCM acima dos limites de referência para a espécie; indica que células eritróides imaturas estão presentes ou há defeito na maturação eritrocitária) e apresentando hiperplasia compensatória da medula óssea, granulocitose, reticuloendoteliase, aumento no tamanho médio do corpúsculo e volume celular, levando a uma fragilidade osmótica dos eritrócitos (Losos, 1986; Carneiro et al., 2009).

A anaplasiose leva ao quadro hematológico de anemia hemolítica autoimune (AHA), que é condição clínica causada pela remoção das hemácias sadias da circulação. Segundo Bradley e Friedberg (2002), a AHA ocorre quando as imunoglobulinas IgG e IgM

ligam-se à superfície antigênica das células vermelhas do sangue e iniciam a destruição destas pela via do sistema de complemento e do sistema monocítico fagocitário. A AHA é caracterizada pela produção de anticorpos diretamente contra as células vermelhas do próprio animal sendo que os anticorpos que geralmente são direcionados para combater antígenos, neste caso específico, apresentam reatividade contra as hemácias.

O grau de hemólise é dependente de características de ligação do anticorpo como: quantidade, especificidade, habilidade de fixar complemento, habilidade de ligar-se aos macrófagos e do antígeno alvo (Bradley e Friedberg, 2002). As IgG são pobres ativadoras da via clássica de complemento, mas são reconhecidas prontamente pela porção Fc das células de defesa (em particular IgG1 e IgG3). Hemácias sensibilizadas pelas IgG geralmente são eliminadas da circulação pelos fagócitos do sistema monocítico fagocitário. Desde que as células do sistema monocítico fagocitário também tenham receptores para os fatores de complemento C3 e C3b, estes componentes dos complementos, se presentes, podem potencializar a hemólise extravascular. Por outro lado, hemácias sensibilizadas pelas IgM geralmente estão associadas a uma combinação de hemólise intra e extravascular. A hemólise intravascular ocorre porque o IgM, ao contrário do IgG, ativa rapidamente a via clássica do complemento e esta é estimulada a produzir citólise. No entanto, devido às proteínas reguladoras das hemácias como o fator de deterioração acelerada (DAF, CD59), a cascata de complemento é ativada para produzir um quadro agudo de hemólise intravascular (Bradley e Friedberg, 2002).

Os sinais clínicos da anaplasiose, evidentes em animais susceptíveis, não são específicos, sendo necessário o diagnóstico diferencial para outras doenças. Coelho (2007), em situação experimental de estudo comportamental da doença, desafiou animais

com amostra de *Anaplasma marginale* sem apêndice (amostra UFMG2) e observou período de incubação de 12 dias, período de patência de 14 dias, período de convalescença de aproximadamente 10 dias e altos picos de parasitemia, sendo que esta atingiu o seu valor máximo dois dias antes do pico de anemia. Em relação aos parâmetros vitais, verificou-se aumento da temperatura retal acima dos valores fisiológicos de todos os animais, assim como aumento nas frequências cardíacas e respiratórias.

A elevação da temperatura corporal é mediada por citocinas produzidas por macrófagos: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6). Estas citocinas apresentam um amplo espectro de atividades biológicas que auxiliam a coordenar as respostas do organismo contra a infecção. Além disso, são também denominadas de pirógenos endógenos, pois elevam a temperatura corporal. A IL-1, IL-6 e o TNF- $\alpha$  ativam hepatócitos para sintetizar proteínas de fase aguda, aumentam a liberação de neutrófilos pela medula óssea e funcionam como opsoninas, o que potencializa a eliminação de patógenos opsonizados (Janeway et al., 2001).

Um importante efeito dessas citocinas é sua ação sobre o hipotálamo, alterando a regulação da temperatura corporal, e sobre as células musculares e adiposas, alterando a mobilização de energia para a elevação da temperatura. Em temperaturas elevadas, a replicação bacteriana e viral é reduzida, enquanto o processamento do antígeno é aumentado (Janeway et al., 2001).

Quando o animal está inapetente devido à doença, juntamente com os quadros de febre, ocorre um aumento na sua demanda energética levando a um maior consumo de glicose, e assim, este se torna hipoglicêmico. Associado a estes dois fatores, ocorrem quadros de desidratação levando a uma

diminuição no líquido extracelular e consequentemente hipovolemia, causando um quadro de insuficiência renal e diminuindo a excreção de  $H^+$  (Garry, 1994). A diminuição do volume extracelular causada por uma menor perfusão periférica, redução do débito cardíaco e da perfusão renal faz com que ocorra um aumento do metabolismo anaeróbio do animal, aumentando a produção de lactato e levando aos quadros de acidose metabólica sistêmica (Underwood, 1992; Garry, 1994).

Os aumentos significativos nas frequências cardíacas (FC) e respiratórias (FR) são uma resposta fisiológica às alterações causadas pela hipóxia tecidual e acidose metabólica. O aumento na FC só ocorre quando as concentrações de hemoglobina estão muito baixas para garantir uma boa distribuição de oxigênio nos tecidos. O aumento da FR ocorre secundariamente à anemia e à acidose metabólica sendo responsável pela oxigenação do sangue e pela eliminação do  $CO_2$ , principal componente respiratório da acidose. A elevação da FR permite uma maior excreção de  $CO_2$ , confirmada pela redução da  $pCO_2$ . Juntamente com o aumento da FR se observa a redução dos níveis de  $HCO_3^-$ , principal tampão do líquido extracelular e maior responsável pela manutenção do pH sanguíneo ( $HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow CO_2 + H_2O$ ). Nos rins, os íons bicarbonato do sangue induzem uma taxa adequada de secreção tubular de íons hidrogênio, confirmada pela acidificação da urina, contribuindo para um pH adequado do sangue (Coelho, 2007).

O aumento na concentração de  $H^+$  no meio extracelular e a redução na sua excreção devido à falha na perfusão renal levam o organismo a utilizar outros mecanismos compensatórios além dos citados anteriormente para o restabelecimento da normalidade. Os íons  $H^+$  movem-se do espaço extracelular para o espaço intracelular, fazendo com que o potássio ( $K^+$ ) saia do espaço intracelular (uma vez

que sua concentração é maior no interior das células) e aumente sua concentração no meio extracelular. Este mecanismo é conhecido como hipercalemia relativa (Underwood, 1992; Garry, 1994).

O quadro descrito acima é dependente do nível de parasitemia, pois com o seu aumento ocorre a diminuição do hematócrito e iniciam-se os mecanismos de compensação do organismo para a tentativa de restabelecimento dos parâmetros fisiológicos normais (Coelho, 2007).

## **2.5. Resposta imune na infecção por *Anaplasma marginale***

### **2.5.1 Caracterização da resposta imune dos ruminantes**

Existem basicamente duas categorias de imunidade nos mamíferos: a imunidade inata e a imunidade adaptativa ou adquirida, sendo o sistema imune inato o de predomínio durante os estágios iniciais de infecção. Este constitui a primeira linha de defesa contra qualquer variedade de agente patogênico e envolve as células com habilidade de fagocitose não específica de materiais estranhos ao organismo (Kurz, 2004). Este sistema é ativado por antígenos, porém sua resposta não é ampliada por repetidas exposições (Tizard, 2000). Em contraste, a resposta adquirida ou adaptativa reconhece agentes específicos determinantes e é mediada pelas células apresentadoras de antígenos (APC). No caso do hospedeiro sofrer contato com o mesmo antígeno mais de uma vez, uma reação imune exacerbada pode ocorrer devido à memória imunológica (Janeway et al., 2001). O sistema imune inato e o adquirido apresentam a capacidade de reconhecer determinados componentes dos patógenos chamados de PAMP (Padrão Molecular Associado ao Patógeno), como os lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos e DNA bacteriano (Hornef et al., 2002). O reconhecimento dessas moléculas pelas

células de defesa do hospedeiro depende do número de receptores de membrana (TLR), os quais sinalizam durante o início da resposta imune (Kurz, 2004).

### **2.5.2. Soroconversão**

A soroconversão pode ser definida como a transição de uma situação em que os anticorpos contra um determinado agente infeccioso estão ausentes em amostras de sangue, para aquela em que estes anticorpos são detectáveis pelos métodos usuais em laboratório clínico. A soroconversão é dita completa quando anticorpos da classe IgG, de alta avidéz frente aos antígenos dos agentes infecciosos, estão presentes no sangue (Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde, 2007).

A titulação zero (mensurada pelo teste ELISA), não é indicativa de animal negativo, pois se pode estar quantificando imunoglobulinas exatamente em um momento onde a quantidade de anticorpos ainda não tenha atingido um nível mensurável pelo teste diagnóstico e, portanto, uma segunda quantificação seria definitiva para confirmar a manutenção da ausência de anticorpos e/ou o surgimento de titulação positiva. Um título muito alto poderá ser associado a sinais clínicos patoginômicos para conclusão do diagnóstico da doença, porém se o animal não apresentar sinais claros ou se estiver saudável, um alto título indica ou que este entrou em contato com o agente e convalesceu, ou apresenta resposta à vacinação (Tizard, 2000).

### **2.5.3. Resposta imune na infecção por *Anaplasma marginale***

O *A. marginale* é capaz de sobreviver e replicar em um hospedeiro imunocompetente por pelo menos sete anos. Um bovino persistentemente infectado é capaz de apresentar uma resposta imune adaptativa, o que é indicado por altos títulos

de anticorpos, responsividade de células T e habilidade em prevenir altos níveis de ricketsemia e doença clínica frente a um desafio com espécie homóloga. Apesar disso, o hospedeiro é incapaz de eliminar a infecção (Palmer, 2002).

O desenvolvimento de uma imunidade eficiente e duradoura contra o *A. marginale*, para auxiliar no controle da infecção e na recuperação total dos animais, depende de uma perfeita interação entre as respostas humoral e celular. Estas, por sua vez, dependem do estímulo antigênico de cada cepa do microorganismo, podendo os antígenos ser classificados em duas categorias: antígenos solúveis e corpusculares (Losos, 1986).

Os antígenos solúveis são glico ou lipoproteínas originadas a partir do metabolismo bacteriano. Estas proteínas são encontradas no plasma e no interior das células parasitadas durante a fase aguda da doença, atingindo seu pico entre um e dois dias antes do pico de parasitemia. Porém, estes antígenos não promovem o desenvolvimento de imunidade e aparentam estar relacionados à patogenia da anemia auto-imune (Ristic, 1960).

Os antígenos corpusculares são proteínas específicas presentes na superfície da *A. marginale* (proteínas principais de superfícies - MSP). Estes antígenos induzem a produção de imunoglobulinas, principalmente a IgM, durante a fase de início da ricketsemia, e em seguida, a IgG2, durante o período de patência da infecção (Grafias et al., 2003). Estes anticorpos funcionam como opsoninas, facilitando a fagocitose e a destruição dos microorganismos pelos macrófagos e também bloqueando a invasão de novas hemácias (Buening, 1973).

Kocan et al. (2003) identificaram seis tipos de proteínas principais de superfície (MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e

MSP5) em microorganismos da espécie *A. marginale*. As MSP1a e MSP1b são adesinas, sendo a MSP1a responsável pela adesão do agente às células intestinais e às glândulas salivares dos carrapatos e eritrócitos bovinos e a MSP1b responsável pela adesão do agente aos eritrócitos dos bovinos. MSP2 e MSP3 parecem estar ligadas à indução de uma resposta protetora contra *A. marginale* e MSP4 e MSP5, aparentemente, ainda possuem função desconhecida, sendo que a MSP5 induz a produção de anticorpos específicos, que podem ser detectados por exames sorológicos, tendo utilidade diagnóstica.

A ocorrência de variação antigênica destas proteínas durante a fase crônica da anaplasmosose é um mecanismo de evasão da resposta imune e pode estar associada às flutuações na ricketsemia durante o estado de portador, à manutenção da imunidade e ao desenvolvimento de proteção contra cepas heterólogas (Keiser et al., 1990).

A imunidade contra *A. marginale* envolve mecanismos humorais e celulares. O linfócito T CD4<sup>+</sup> é tido como peça central do sistema imune expressando interferon gama (INF- $\gamma$ ), que é responsável pela síntese de IgG bovina, subclasse IgG2 e que também ativa macrófagos e os estimula a aumentar seus receptores de expressão, fagocitose, fusão do fagolisossoma e produção de óxido nítrico (Grafias et al., 2003 e Kocan et al., 2003).

As proteínas principais de superfície (MPS), identificadas nos corpúsculos iniciais de *A. marginale* (Palmer, 2002), estão envolvidas na resposta imune contra anaplasmosose. Brown et al. (1998) demonstraram que MSP purificadas podem induzir a resposta por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e, assim, prevenir a ricketsemia. A terminação carboxila da MSP1a, que se conserva entre os isolados, é preferencialmente reconhecida por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Brown et al., 1998). Estas proteínas induzem a produção de anticorpos

relacionados ao controle da ricketsemia aguda (Tebele et al., 1991), visto que anticorpos contra MSP1 bloqueiam corpúsculos iniciais de *A. marginale* (McGarey e Allred, 1994).

O envolvimento de anticorpos na imunidade contra *A. marginale* tem sido investigado, e foi demonstrando uma correlação entre altos títulos de anticorpos contra as MSP e proteção contra a doença. Entretanto, os problemas determinados pela variação antigênica e pela ausência de proteção contra o desafio após administração de soro imune enfatizam a importância de células T CD4<sup>+</sup> na resposta imune contra anaplasmosose sendo essas as células de ligação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa (Brown et al., 1998).

Na resposta imunológica contra *Anaplasma marginale*, as respostas humorais e celulares agem em conjunto para combater a infecção, conforme demonstrado na figura 3. Os linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>), estimulados por antígenos de *Anaplasma marginale*, produzem interferon gama (IFN- $\gamma$ ), o qual atua sobre macrófagos e linfócitos B. Sobre os macrófagos, o IFN- $\gamma$  estimula a expressão de receptores de Fc, facilitando a fagocitose do agente, aumentando a fusão do fagossomo com o lisossomo e a produção de óxido nítrico, resultando na destruição intracelular do microorganismo além de liberar IL-12, que estimula as células T e NK a fagocitar células infectadas e liberar IFN- $\gamma$ . Nos linfócitos B, o IFN- $\gamma$  estimula a produção de IgG2, apresentando importante função na opsonização de *A. marginale* para a fagocitose (Araújo et al., 2003).

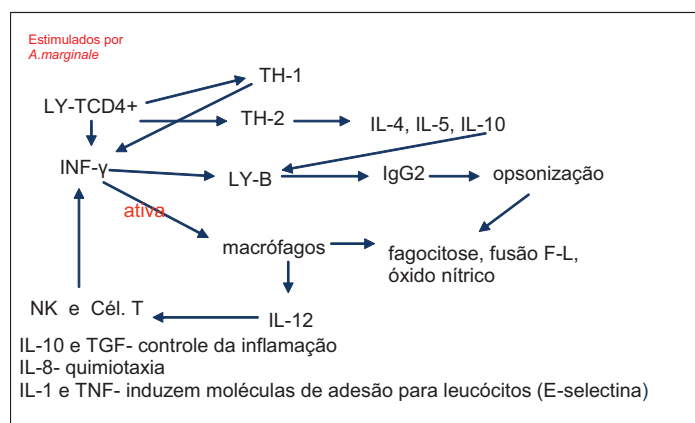


Figura 3. Esquema da resposta imune na anaplasmosose.

LY: linfócito; TH: linfócito T-helper; IL: interleucina; INF: interferon; NK: células natural killer; F-L: fusão fagossoma-lisossoma. TGF: fator de crescimento tumoral; TNF: fator de necrose tumoral.

Fonte: adaptado de Araújo et al. (2003)

O sistema de complemento também faz parte da resposta imune e consiste de várias proteínas plasmáticas que são ativadas pelos microorganismos, promovendo a destruição destes e a inflamação. (Abbas e Lichtman, 2005).

A proteína central do sistema do complemento, C3, é clivada, e o seu fragmento maior C3b é depositado na superfície microbiana em que o complemento é ativado. O C3b se torna covalentemente ligado ao microorganismo e atua como uma opsonina para iniciar a

fagocitose dos mesmos. Um fragmento menor, C3a, é liberado e estimula a inflamação agindo como quimioatraente para neutrófilos. O C3b liga-se a outras proteínas do complemento para formar uma protease que cliva uma proteína chamada C5, gerando um peptídeo secretado (C5a) e um fragmento maior (C5b) que permanece fixado às membranas celulares microbianas. O C5a estimula a entrada de neutrófilos no sítio da infecção, bem como o componente vascular da inflamação aguda. O C5b inicia

a formação de um complexo das proteínas de complemento, C6, C7, C8 e C9, as quais são reunidas em um poro da membrana que causa a lise das células na qual o complemento está ativado (Janeway et al., 2001), conforme figura 4. A cascata é desencadeada pelo reconhecimento direto de certas estruturas da superfície microbiana (MSP) e pela lectina, uma proteína plasmática que reconhece resíduos terminais de manose em glicoproteínas e glicolipídeos microbianos.

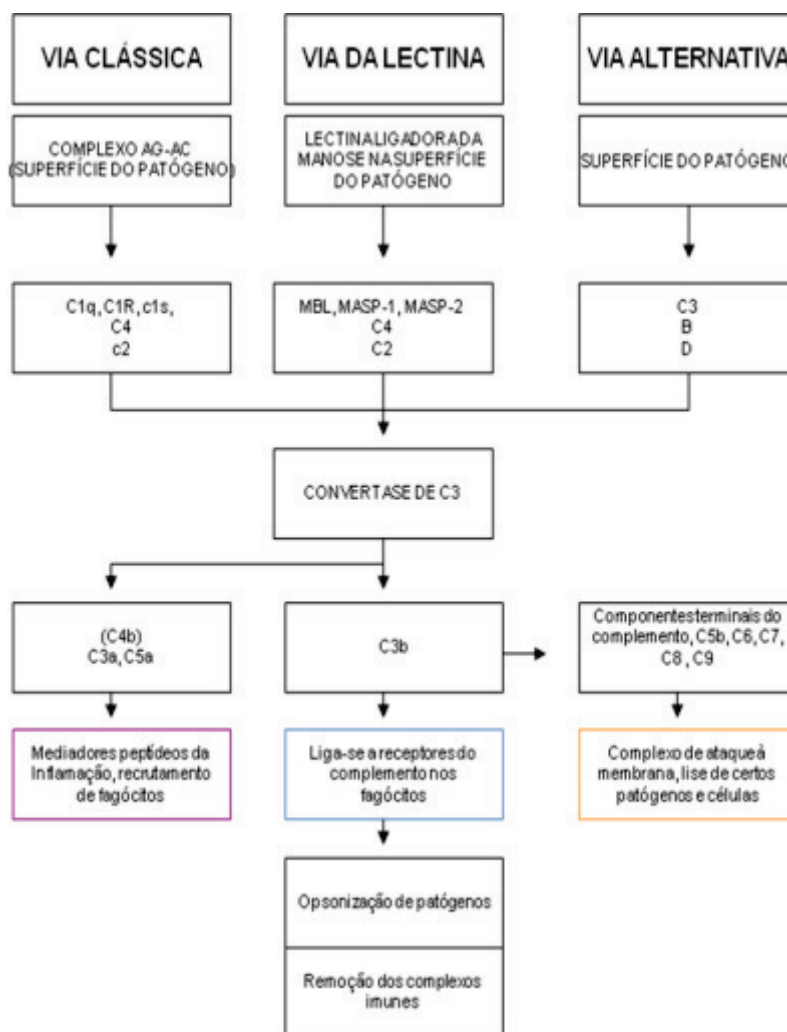


Figura 4. Via do sistema da cascata de complemento.  
Fonte: Janeway et al. (2001)



## 2.6. Vacinas contra *Anaplasma marginale*.

A vacinação é considerada um meio econômico e efetivo para controlar parcialmente a anaplasmose num contexto mundial. Existem dois tipos principais de vacinas: vivas e inativadas. As duas formas são originadas de eritrócitos ou de cultivo celular com *A. marginale* como fonte de antígeno e ambas induzem imunidade protetora, diminuindo ou prevenindo a manifestação da doença clínica, porém nenhum tipo é capaz de prevenir os animais de se tornarem persistentemente infectados. A infecção persistente nos animais contribui para a propagação do *A. marginale*, pois estes são tanto fontes de transmissão mecânica quanto biológica. Segundo Kocan et al. (2010), vacinas desenvolvidas com tecnologia molecular poderiam representar um método de controle mais efetivo contra a anaplasmose, porém tais vacinas ainda não foram desenvolvidas.

### 2.6.1. Vacinas vivas de *Anaplasma marginale*.

Vacinas vivas são produzidas a partir da inoculação no animal de eritrócitos infectados com *A. centrale* ou *A. marginale* atenuado. Outra estratégia consiste em infectar o animal com cepas de *A. marginale* e, em seguida, realizar um tratamento com tetraciclina quando a temperatura corporal começar a elevar ou quando for detectado parasitemia através de esfregaços de sangue. Este método requer um monitoramento minucioso dos animais e não deve ser aplicado em grandes rebanhos devido à possibilidade de falhas no monitoramento. Mesmo com o tratamento com tetraciclina no início da infecção, o controle das reações pós inoculatórias é muitas vezes ineficaz em prevenir a fase aguda da doença, sendo este tipo de vacina mais indicada para a vacinação de animais jovens (Kuttler e Todorovic, 1973).

Kessler et al. (1991), trabalhando com vacinas vivas atenuadas, inocularam eritrócitos infectados com *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* e *Anaplasma centrale* em bovinos em situação experimental de campo. Os autores encontraram resultados satisfatórios, com poucos animais desenvolvendo sintomatologia clínica.

Em estudos realizados na Austrália por Bock e de Vos (2001), o uso de vacina viva de *A. centrale* foi efetivo no controle da infecção por *A. marginale*, pois, embora a resposta imune seja variável, a proteção contra o desafio foi adequada para prevenir a infecção na maioria dos casos.

A amostra vacinal de *Anaplasma centrale*, isolada por Sir Arnold Theiler em 1910, é hoje a mais utilizada em todo o mundo para o controle da anaplasmose bovina (Kocan, 2010). Esta amostra encontra-se disponível para uso em várias localidades como África, Austrália, Israel e América Latina. Theiler (1910) observou que o *A. centrale* é menos patogênico que o *A. marginale* e que animais infectados com *A. centrale* desenvolvem imunidade contra a infecção por *A. marginale*. Tanto o *A. centrale* quanto o *A. marginale* compartilham epitopos imunodominantes, o que pode desempenhar um papel de proteção induzida pelo *A. centrale* (Shkap et al., 2002). Pesquisas demonstraram que a variação antigênica da MSP2 que ocorre durante a infecção persistente por *A. centrale* é similar à descrita para o *A. marginale*. Epitopos de células TCD4<sup>+</sup> são conservados na resposta à infecção pelas duas espécies de anaplasma, o que contribui para o desenvolvimento de uma proteção cruzada induzida pela vacina viva de *A. centrale* (Shkap et al., 2002).

Em 1991, Montenegro et al., após inocularem  $1 \times 10^{10}$  corpúsculos de *A. marginale* de alta patogenicidade em animais pré-imunizados, observaram que os animais vacinados com vacina purificada de corpúsculos iniciais de *A. marginale* demonstraram uma boa proteção contra o

desafio homólogo e heterólogo, proteção esta caracterizada por uma baixa parasitemia e mínima redução do hematócrito. Assim, os autores concluíram que o uso de imunógenos produzidos através de purificação de corpúsculos iniciais de *A. marginale* oferece uma alternativa em potencial para o controle da anaplasose bovina.

Conduzindo experimento utilizando vacinas vivas atenuadas através de subsequentes passagens em animais esplenectomizados, Rodríguez et al. (2000) trabalharam com quatro grupos de cinco animais cada, sendo três grupos vacinados e um controle. Os grupos vacinados receberam duas doses da vacina, intervaladas de 21 dias. A vacina utilizada no grupo um continha  $1,5 \times 10^{10}$  corpúsculos de *A. marginale*, a do grupo dois  $3 \times 10^{10}$  e a do grupo três,  $6 \times 10^{10}$ . Todos os grupos foram desafiados com  $1 \times 10^8$  corpúsculos de *A. marginale* 21 dias após a última vacinação e, com exceção dos não vacinados, apresentaram soroconversão e altos títulos de IgG. Neste experimento não se observou diferença entre o período de incubação, independente da dose de vacinação. O grupo controle apresentou um quadro de anaplasose aguda e queda de 73,4% do volume globular, alcançando uma parasitemia de 30,9%. Dos 15 animais vacinados, somente um manifestou a doença, sendo que todos os outros ficaram livres dos sinais clínicos, com ricketsemias baixas (3,2%, 3,8% e 4,3%, respectivamente, para os grupos 1, 2 e 3). A queda de VG foi de 49,9%, 47,8% e 49,3% respectivamente.

Em experimento semelhante, Bastos et al., (2009), trabalharam com quinze animais divididos em três grupos de cinco animais. O grupo um foi inoculado com 1,8 mL de *A. marginale* (amostra com apêndice de baixa patogenicidade – UFMG 1) cultivada em células IDE8 contendo  $3,7 \times 10^7$  corpúsculos iniciais, o grupo dois inoculados com 1,2 mL de *A. marginale* contendo  $2 \times 10^7$  corpúsculos de *A. marginale* obtidos de eritrócitos infectados (amostra UFMG 1) e o

grupo três com 1,2 mL de solução salina. Após 75 dias, todos os grupos foram desafiados com 1,8 mL contendo  $5 \times 10^7$  corpúsculos iniciais de *A. marginale* amostra UFMG 2 (amostra de alta patogenicidade). Os animais do grupo um e dois tiveram ricketsemia, redução do VG, apresentando valores entre 55 e 63% (respectivamente) quando comparados ao grupo controle, porém estes animais demonstraram sinais clínicos moderados da doença, não necessitando de tratamento e com recuperação espontânea. Após inoculação da amostra UFMG 2, nenhum dos animais dos grupos um e dois apresentaram sinais clínicos e a queda do hematócrito foi insignificante quando comparado com o primeiro desafio (UFMG 1), entretanto, animais do grupo três tiveram uma grande redução do hematócrito (71%), elevada ricketsemia (15,6%) e uma redução do período pré-patente (13 dias em média), sendo que 3 de 5 animais do grupo controle morreram com grave quadro de anaplasose.

Apesar de Bastos et al., (2009) terem encontrado uma resposta protetora utilizando cepa atenuada de *Anaplasma marginale*, os animais apresentaram sintomatologia clínica, o que em situação de campo poderia ter levado os animais a óbito. Motivando-se assim, o desenvolvimento de experimentos com vacinas inativadas, reduzindo o risco de reações pós inoculatórias.

### **2.6.2. Vacinas inativadas de *Anaplasma marginale*.**

Vacinas mortas foram desenvolvidas nos Estados Unidos na década de 60 e comercializadas até 1999, quando foram retiradas do mercado. Este tipo de vacina apresenta vantagens em relação às vacinas vivas, dentre elas o baixo risco de contaminação com agentes infecciosos (hemoparasitas e vírus), o baixo custo de estocagem e o baixo índice de reações

indesejáveis pós-inoculação. Por possuir estas características, este tipo de vacina é mais indicado para animais adultos. As desvantagens apresentadas por estas vacinas são a necessidade de revacinações anuais (boosters), o alto custo da purificação das amostras de *A. marginale* dos eritrócitos e a falta de proteção cruzada contra isolados de diferentes áreas geográficas, além da imunidade oferecida por estas vacinas ser usualmente menos efetiva do que a oferecida pelas vacinas vivas (Kocan, 2010).

A primeira vacina morta comercializada para o controle da anaplasiose foi desenvolvida através de amostras de *A. marginale* obtidas de eritrócitos hemolisados e posteriormente liofilizados. Este produto foi então combinado com um adjuvante oleoso no momento da inoculação (Brock et al., 1965). Esta vacina continha estroma eritrocitário, o que resultou no desenvolvimento de isoanticorpos eritrocitários em animais vacinados. Assim, animais que ingeriram colostro contendo altos títulos de anticorpos provenientes de animais vacinados desenvolveram anemia hemolítica (Dennis et al., 1970). Este problema foi minimizado implementando-se procedimentos de purificação, os quais reduzem a quantidade de estroma eritrocitário nas vacinas (Hart et al., 1981). Uma técnica para a produção desta vacina em larga escala foi desenvolvida (McCorkle et al., 1985), o que possibilitou o seu uso até 1999.

Munderloh et al. (1994) estabeleceram uma linhagem de células de carrapatos derivadas de *Ixodes scapularis*, denominada IDE8, sistema no qual se tem conseguido multiplicar *in vitro* várias rickettsias, dentre elas, *Anaplasma marginale*. O cultivo *in vitro* consistiu importante avanço para o desenvolvimento de métodos de produção de antígenos para fins de diagnóstico e vacinas, pois o *A. marginale* cultivado nestas células mantém sua morfologia original e permanece infectante para bovinos (Blouin e Kocan, 1998). Por ser imunogênico, o material obtido de cultivo celular pode ser

utilizado como inóculo (de la Fuente et al., 2002b).

No modelo experimental realizado por Kocan et al., (2001), 22 animais holandeses divididos em dois grupos de 11 animais foram utilizados. O grupo um recebeu duas doses da vacina cultivada em células IDE8 e inativadas com  $\beta$ -propilactone (BPL), com quatro e oito semanas de idade com uma dose de 5 mL por via subcutânea contendo o antígeno ( $2 \times 10^{10}$  corpúsculos de *A. marginale*) em adjuvante oleoso (Adjuvante XtendIII® Grand Laboratories, Larchwood, IA). O grupo dois foi mantido como controle, não sendo vacinado. Ambos foram desafiados com uma amostra contendo  $1 \times 10^5$  eritrócitos infectados com *A. marginale*, amostra Virginia, dez semanas após a última imunização. Os pesquisadores observaram uma maior taxa de anticorpos anti-MSP5 (titulados por ELISA) duas semanas após a última vacinação no grupo vacinado. Animais vacinados apresentaram maior reconhecimento contra MSP1a e MSP1b. A redução do volume globular (VG) dos animais vacinados foi menor ( $p < 0,05$ ) do que a observada no grupo controle, porém em relação ao tempo do período pré-patente, diferenças não foram observadas.

Nove animais em situação experimental, divididos em três grupos de três animais, foram utilizados por de la Fuente et al., (2002b). O primeiro e segundo grupos foram imunizados na primeira, quarta e sexta semanas de vida, sendo o primeiro imunizado com antígenos derivados de cultura celular em células de carrapato IDE8 contendo  $2 \times 10^{10}$  corpúsculos de *A. marginale* (2mL) e inativados com  $\beta$ -propilactone (BPL) e o segundo com antígeno contendo  $2 \times 10^{10}$  corpúsculos de *A. marginale* (2mL) obtido através de eritrócitos infectados. O terceiro grupo foi inoculado com solução salina + adjuvante (grupo controle). O desafio foi feito com carrapatos *Dermatocentor viribilis* infectados com *A. marginale*, cepa

Oklahoma, colocados diretamente sobre os animais, oito semanas após a última vacinação. Os animais imunizados com antígenos de cultura celular de IDE8 demonstraram melhor reconhecimento de MSP1b, enquanto o grupo imunizado com antígenos originados de eritrócitos infectados demonstrou um melhor reconhecimento para MSP1a (avaliados através do teste ELISA). Não houve diferença para os parâmetros avaliados entre os grupos vacinados ( $p > 0,05$ ). Animais imunizados, independente da forma de imunização, apresentaram uma quantidade menor de eritrócitos infectados e hematócrito mais elevado quando comparados ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ) e também não demonstraram sinais clínicos de anaplasiose, indicando que vacinas mortas cultivadas em células de carrapato apresentam um grande potencial para serem utilizadas como antígenos.

Desafiando animais vacinados (vacina de *A. marginale* cultivada em células embrionárias de carrapato IDE8 e inativadas com  $\beta$ -propilactone (BPL), emulsificadas com o adjuvante Freund's) com  $3 \times 10^6$  corpúsculos de *A. marginale* por animal após fazer quatro vacinações com intervalos de três semanas entre elas, Blouin et al., (2002) observaram que os animais imunizados apresentaram um período pré-patente maior, baixas parasitemias e menor diminuição do volume globular, condizendo com os resultados obtidos nos experimentos anteriormente citados.

Figuroa Millà et al.(1999), utilizando vacina comercial inativada no México, encontrou diferença na parasitemia entre animais vacinados e não vacinados porem, a vacina não protegeu os animais em infecção natural a pasto. A falha da vacina em questão foi justificada pela possível diferença entre os antígenos vacinais e do desafio, não protegendo contra o desafio heterólogo.

Kuttler et al., (1984), utilizando vacina comercial inativada, observaram que esta induziu nível de imunidade satisfatória ao desafio com cepa de *Anaplasma marginale* amostra Virginia (VAM) e foi pouco efetiva ao desafio com a amostra da Florida (FAM). Os autores sugerem que, estudos epidemiológicos dos isolados de *Anaplasma marginale* sejam feitos aonde ocorram necessidade de vacinas inativadas .

### 3. MATERIAL E MÉTODOS:

O experimento compreendeu a seleção, criação, vacinação, desafio e acompanhamento dos animais vacinados com vacinas inativadas e desafiados experimentalmente.

#### 3.1. Local e período

O experimento foi conduzido nas instalações da Clínica de Ruminantes do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária - UFMG, no período de Outubro de 2009 a Junho de 2010.

#### 3.2. Criação dos Animais

Foram utilizados 20 bezerros machos Holandeses Preto e Branco (HPB), nascidos entre Outubro e Novembro de 2009, provenientes de uma fazenda de sistema intensivo de exploração leiteira, situada no município de Inhaúma/MG a 100Km de Belo Horizonte.

Os animais nasceram em baias maternidades com camas de feno, garantindo assim a não infestação por carrapatos. Logo após o nascimento, os umbigos foram curados com iodo a 10% e a colostragem foi feita com seis litros de colostro, dividida em duas refeições, sendo a primeira duas horas e a segunda 12 horas após o nascimento.

As instalações da Clínica de Ruminantes do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG compreendiam um galpão de alvenaria, aberto nas laterais e fechado com

telas, o que não permitiu a entrada de moscas (figura 5). Este galpão era lavado diariamente e as fezes dos animais recolhidas duas vezes ao dia sempre antes do arraçãoamento.



Figura 5. Instalações da Clínica de Ruminantes do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária da UFMG.

Ao chegarem ao galpão, os animais com 24 a 48 horas de vida passaram por uma coleta de sangue para obtenção de soro e posterior análise de proteína plasmática em refratômetro manual. Em seguida, foram alocados em baias com cama de serragem (figura 6A) até a secagem do umbigo e, posteriormente, foram transferidos para baias individuais com tapete de borracha (sistema tie stall) (figura 6B). As acomodações estavam livres de carrapatos.

O aleitamento foi realizado até 45 dias de idade com raspa de leite em pó<sup>1</sup> (130g/L) diluído em água morna a 37°C, duas vezes ao dia, sendo uma pela manhã e outra à tarde. Até 30 dias de idade, os animais receberam seis litros de leite e de 30 a 45 dias de idade, receberam quatro litros de leite por dia.

Foi oferecido concentrado comercial com 18% de proteína nas seguintes quantidades: de 15 a 30 dias, *ad libitum*; de 30 a 60 dias, um Kg/animal/dia e a partir de 60 dias até o final da fase experimental, dois Kg/animal/dia e água *ad libitum*.

O feno foi oferecido a partir de 45 dias (três Kg/animal/dia) e posteriormente limitado em seis Kg/animal/dia até o final do período experimental. O feno e o concentrado comercial também foram ofertados duas vezes ao dia

Todos os animais foram banhados semanalmente (bomba costal de 20L) com acaricidas (amitraz<sup>2</sup>) na diluição de 2mL/L e na proporção de cinco litros da solução por animal até o dia do desafio. Janelas, portas e telas do galpão também eram banhadas com o mesmo produto.

<sup>1</sup> Raspa de leite – Itambé – Brasil

<sup>2</sup> Amitraz comercial: Triatox® Schering-Plough Coopers



Figura 6. Acomodações dos animais no galpão do hospital veterinário da Escola de Veterinária de UFMG. 6A: Baias com cama de serragem. 6B: Baias individuais com tapete de borracha (sistema tie stall).

### 3.3. Preparo de vacinas de *Anaplasma marginale*

A vacina foi desenvolvida e produzida no laboratório de Protozoologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG), utilizando o cultivo das cepas UFMG1 e UFMG2 em células de carrapato IDE8 conforme Bastos et al., (2007).

O número de corpúsculos de inclusão foi determinado em câmara hemocimétrica. Foram contados cinco quadrados e o resultado multiplicado por  $5 \times 10^5$ . O volume foi ajustado para 2mL de forma a conter aproximadamente  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *A.marginale*.

A inativação do antígeno utilizou beta propiolactone (BPL) e a determinação da viabilidade dos corpúsculos iniciais foi acompanhada conforme técnica descrita por Gray & Morris (1987). A técnica consistiu em incubar um vol. da suspensão de *A.marginale* com quatro vol. de uma solução DAF-BE (Diacetato de Fluoresceína-Brometo de Etídio), por 10 minutos, à

temperatura ambiente. Foi feito esfregão e, após secagem, foi examinado sob imersão em microscópio de imunofluorescência. As rickettsias viáveis apresentaram-se na cor verde brilhante e as inativadas em roxo. Foram utilizados dois adjuvantes para as vacinas, sendo um oleoso e o outro a saponina. Três tipos de vacinas foram produzidos: uma contendo corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso, outra contendo corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina e uma terceira vacina contendo sobrenadante da cultura + saponina.

### 3.4. Grupos experimentais

Os bezerros (n=20) com idades entre 60 e 90 dias foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais conforme tabela 1. Neste momento foi realizada pesquisa de *babesia* spp e *Anaplasma marginale* através da técnica de esfregão sanguíneo por três dias consecutivos e sorologia por ELISA. Todos os animais foram negativos na pesquisa dos parasitas e para a presença de anticorpos.

Tabela 1. Grupos experimentais de bezerros vacinados com vacinas inativadas de *A. marginale* cultivado em células IDE8, com intervalos de 22 dias entre a primeira e a segunda dose e 32 dias entre a segunda e a terceira dose, por via subcutânea. Belo Horizonte, 2010.

Grupo	Nº animais	Tratamento
1	5	Vacina com adjuvante oleoso contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> (3mL)
2	5	Vacina contendo $3 \times 10^9$ corpúsculos de <i>Anaplasma marginale</i> + sobrenadante da cultura e adjuvante saponina (2mL)
3	5	Vacina com sobrenadante da cultura + saponina (2mL)
4	5	Solução salina + solução oleosa (3mL)

Após 32 dias da última dose vacinal, os bezerros estavam entre cinco e seis meses de idade e todos foram desafiados através da inoculação endovenosa de *A. marginale* cepa UFMG2, na dose de  $3 \times 10^5$  corpúsculos obtidos através de inoculação experimental em bezerros esplenectomizados.

### 3.5. Monitoramento dos grupos experimentais

#### 3.5.1. Exame clínico

Os animais foram monitorados diariamente (antes e após o desafio), no mesmo horário, através da avaliação da temperatura corporal e das frequências cardíaca e respiratória. O monitoramento deu-se até o dia em que os animais alcançaram o hematócrito de 26% após serem tratados.

Foi considerado como período de incubação aquele compreendido entre o dia do desafio com UFMG2 até o aparecimento de corpúsculos de *A. marginale*. O período patente compreendeu aquele da primeira parasitemia até o tratamento. E o período de convalescença foi aquele considerado após o tratamento dos animais com antibióticoterapia até o hematócrito de 26%

#### 3.5.2. Avaliação da imunidade humoral

Os soros dos animais experimentais foram obtidos por punção de sangue da veia jugular com tubo *vacutainer* sem

anticoagulante e em seguida o sangue foi centrifugado a 3.500 rpm por 10 minutos em centrífuga Excelsa Baby I (modelo 206-FANEM®).

A pesquisa e titulação de anticorpos IgG total anti-*A. marginale* foi realizada através do teste ELISA, utilizando-se os soros na diluição de 1:4000 (conforme descrito por Saliki et al., 1998). Anticorpos anti-*A. marginale* foram pesquisados 14 dias após cada vacinação pelo teste ELISA.

#### 3.5.3. Avaliação da parasitemia

A parasitemia dos animais foi avaliada através de esfregaço de sangue e citometria de fluxo.

As amostras de sangue foram obtidas pela punção da veia jugular, utilizando-se tubos tipo *vacutainer* com EDTA. Esfregaços de sangue foram confeccionados em lâminas de vidro e corados pelo corante PANÓTICO. Para a realização da citometria de fluxo, os tubos *vacutainer* continham como anticoagulante a heparina.

A técnica para realização da citometria consistiu nas seguintes etapas (técnica adaptada de Gray e Moris., 1987 e Moretta et al., 2008).

- 1) Adicionou-se 3 µl de sangue (coletado com heparina) em 0,2 µl de Syto 16 (marcador de DNA em célula intacta) +

- 1mL PBS 1X em tubos de FAC's de fundo arredondado em poliestireno.
- 2) Incubou-se por 30 minutos a 37°C ao abrigo da luz;
  - 3) Lavou-se os tubos com 2mL PBS 1X (utilizando centrífuga a 1300 rpm por 10 minutos), a 18°C
  - 4) Inverteu-se o tubo para retirada do sobrenadante;
  - 5) O pélete (resíduo que ficou no tubo) foi ressuspensionado em 1mL de PBS 1X;
  - 6) Realizou-se a leitura em citômetro de fluxo (FACSCALIBUR - Becton Dickinson - USA) e, para leitura e análise dos dados, utilizou-se o programa *Cell-Quest*.

Antes do desafio (dia 0), esfregaços de sangue foram realizados semanalmente. Após o desafio, a frequência de realização dos esfregaços foi de três em três dias até o aparecimento da primeira lâmina positiva. A partir de então, os esfregaços foram realizados diariamente. Foram lidos 10 campos por lâmina de esfregaço em microscópio ótico no aumento de imersão (aumento de 100x), contendo aproximadamente 200 eritrócitos por campo.

A citometria de fluxo foi realizada nos dias sete, 14, 17, 20, 23, 27, 29, 31, 34, 36 e 38 após o desafio dos animais.

#### 3.5.4. Avaliação do hematócrito

A realização de microhematócrito para obtenção do volume globular foi realizada utilizando-se tubos capilares das amostras de sangue coletadas diariamente conforme descrito acima. Estes tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos em centrífuga para micro hematócrito (SIGMA I-15<sup>®</sup>) e em seguida foi feita a leitura em cartão de leitura para hematócrito (FANEM<sup>®</sup>).

Antes do desafio (dia 0), a análise do VG foi realizada semanalmente. Após o desafio, a frequência de realização do VG foi de três em três dias até o aparecimento da primeira lâmina positiva. A partir de então foram realizados diariamente até o final do período experimental.

#### 3.5.5. Tratamento dos animais

O parâmetro escolhido para a avaliação da necessidade de tratamento dos animais foi o VG. Gale et al., (1996) consideraram o VG de 15% incompatível com a vida em situações de campo. Entretanto, para escolha do parâmetro utilizado neste experimento foram utilizados os dados de Coelho (2007). Assim, definiu-se que os animais seriam tratados quando o valor do VG atingisse o limite inferior de 10%.

O tratamento foi realizado com um antibiótico parenteral (enrofloxacin 7,5mg/Kg<sup>3</sup>, em dose única). (Carvalho et al., 2008 – comunicação pessoal) este antibiótico possui ótima ação para bactérias intracelulares, como o *A. marginale*. Tratamento suporte com fluidoterapia oral e correção ácido-básica com bicarbonato a 8,4% endovenosa também foram feitos.

## 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis parasitemia obtida por esfregaço de sangue, hematócrito, frequência cardíaca e respiratória e temperatura retal, o delineamento foi inteiramente ao acaso em parcelas subdivididas, constituído por cinco repetições cada tratamento (sendo o bezerro a repetição). As parcelas foram compostas pelos grupos (três grupos vacinados e um grupo controle não vacinado) e as subparcelas pelos dias referentes ao período de patência e convalescença da doença

---

<sup>3</sup> Kinetomax<sup>®</sup> - Bayer



(Sampaio, 2007). O delineamento experimental para a variável parasitemia aferida por citometria de fluxo foi o mesmo das demais variáveis anteriormente citadas, com exceção dos dias que constituíram o fator da subparcela, uma vez que foram considerados os períodos de incubação, patência e convalescência.

O teste de Fisher foi utilizado para comparar as médias dos tratamentos das parcelas para as variáveis “frequência cardíaca e hematócrito”. A variável hematócrito foi transformada pela equação: raiz (variável). As variáveis frequência respiratória, temperatura retal e parasitemia obtida por esfregaço violaram o princípio de normalidade e homogeneidade e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis (Sampaio, 2007). A variável parasitemia obtida por citometria de fluxo violou o princípio de normalidade e homogeneidade e os tratamentos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis (Sampaio, 2007).

Para as variáveis, período de incubação (PI), período de patência (PP) e período de convalescência (PC) o delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, constituído por quatro tratamentos (grupos) e cinco repetições (bezerros). O teste de Fisher foi utilizado para comparar as médias entre os grupos para as variáveis PP e PC. A variável PC foi transformada pela equação: raiz (PC). A variável PI violou os princípios de normalidade e homogeneidade das variâncias, sendo analisada pelo teste de Kruskal-Wallis (Sampaio, 2007).

Como não houve efeito das respostas estudadas (frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal, hematócrito, parasitemia por citometria de fluxo e por esfregaço de sangue) entre os grupos. Foi realizada a correlação de Spearman entre as

variáveis para verificar o efeito das mesmas sobre os animais durante o curso da doença (Sampaio, 2007).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Soroconversão

Todos os animais vacinados com as vacinas inativadas contendo corpúsculos de *Anaplasma marginale* (vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso, vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina) bem como a vacina constituída de proteínas solúveis (vacina com sobrenadante da cultura + saponina), soroconverteram na titulação de 1:4000, ou seja, apresentaram anticorpos contra o agente *Anaplasma marginale* antes de entrarem em contato com o mesmo. O grupo não vacinado se manteve soronegativo até o desafio, mostrando a não ocorrência de transmissão natural durante o experimento e que o esquema de controle no qual os animais foram criados foi eficiente.

Todos os animais vacinados nos dias -86, -64 e -32, tendo o dia zero como dia do desafio, apresentaram anticorpos contra o agente, duas semanas após cada etapa da vacinação. A presença de anticorpos contra *Anaplasma marginale* e/ou suas proteínas solúveis, demonstrou que estes animais responderam a vacinação positivamente com produção de imunoglobulinas.

A soroconversão é condizente com os encontrados por Rodrigues et al., (2000), Kocan et al., (2001), Blouin et al., (2002) e de la Fuente et al., (2002), que encontraram titulação máxima duas semanas após a aplicação da última dose da vacina.

Tabela 2. Experimentos com vacinas de *Anaplasma marginale* cultivadas em células de carrapato IDE8, em relação a idade dos animais, número de doses e intervalos entre elas, tamanho do desafio e cepa utilizada, assim como o tempo para desafio após a última dose da vacina

<b>Autores</b>	<b>Idade dos animais</b>	<b>Nº de doses e intervalos</b>	<b>Desafio (corpúsculos de <i>A.marginale</i>)</b>	<b>Cepa utilizada para desafio</b>	<b>Tempo para o desafio após última dose</b>
Presente experimento	6 meses	3 (32 e 22 dias)	3x10 <sup>5</sup>	UFMG2	32 dias
Kocan et al. (2001)	12 meses	2 (30 dias)	1x10 <sup>5</sup>	Virginia	10 semanas
Blouin et al. (2002)	Nc	4 (21 dias)	3x10 <sup>6</sup>	Nc	4 semanas
de la fuente et al. (2002)	Nc	3 (21 e 14 dias)	60 carrapatos infectados	Oklahoma	8 semanas

\*nc – não citado pelos autores

## 5.2. Período de incubação, período de patência e período de convalescença.

Todos os animais desafiados com a amostra UFMG2 apresentaram parasitemia e 16 animais requereram tratamento por atingir o volume globular de 10%. Dos quatro bezerros não tratados, dois pertenciam ao grupo controle, um ao grupo um e outro do grupo dois. Um dos animais do grupo controle permaneceu com VG normal enquanto os outros apresentaram queda intensa (VG de 11, 13 e 14% e PP de 20, 23 e 18 dias respectivamente) recuperando-se

espontaneamente em seguida.

O período de incubação encontrado neste experimento foi de 20 dias, o período patente variou de 10,4 a 12,3 dias e o período de convalescença de sete a 13,8 dias. Não ocorreu diferença ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos em relação à duração do período de incubação, período de patência e período de convalescença. (Tabela 3).

A Figura 7 representa a linha do tempo relativa aos dias de vacinação, desafio e monitoramento dos animais.

Tabela 3. Valores em dias do período de incubação (PI)<sup>1</sup>, período de patência (PP) e período de convalescença (PC), em função do desafio de bezerros com corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ), cepa UFMG2, nos tratamentos, após protocolo de vacinação

<b>GRUPOS</b>	<b>PI<sup>2</sup></b>	<b>PP<sup>3</sup></b>	<b>PC<sup>3</sup></b>
<b>1</b>	20,0 <sup>A</sup>	10,4 <sup>A</sup>	7,0 <sup>A</sup>
<b>2</b>	20,0 <sup>A</sup>	11,8 <sup>A</sup>	13,8 <sup>A</sup>
<b>3</b>	20,0 <sup>A</sup>	12,3 <sup>A</sup>	9,2 <sup>A</sup>
<b>4</b>	20,0 <sup>A</sup>	12,3 <sup>A</sup>	9,3 <sup>A</sup>
<b>CV</b>	---	38,7%	28,3%

<sup>1</sup>Período de incubação considerado do desafio ao aparecimento de ricketsemia positiva no esfregaço sanguíneo.

<sup>2</sup>Medianas seguidas de letras iguais na coluna são semelhantes pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p>0,05$ ).

<sup>3</sup>Médias seguidas de letras iguais na coluna são semelhantes pelo teste de Fisher ( $p>0,05$ ).

Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso. Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante). Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina. Grupo 4: solução salina + solução oleosa

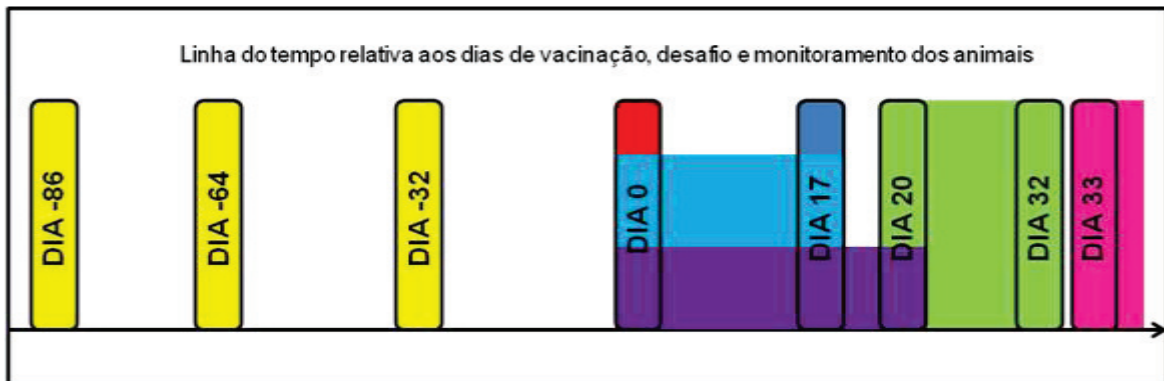


Figura 7. Linha do tempo relativa aos dias de vacinação, desafio e monitoramento dos animais.

- Dias de vacinação (dias -86, -64 e -32). Dias que os animais foram vacinados, em relação ao dia do desafio.
- Desafio dos animais (dia 0). Animais desafiados com  $3 \times 10^5$  hemácias parasitadas com amostras de *A. marginale* UFMG2.
- Período de incubação (dia 0 ao dia 17) considerando a leitura da citometria de fluxo. Dia da inoculação até o dia do aparecimento da primeira parasitemia.
- Período de incubação (dia 0 ao dia 20) considerando a leitura do esfregaço de sangue. Dia da inoculação até o dia do aparecimento da primeira parasitemia.
- Período de patência (dia 17 ao dia 32). Início dos sinais clínicos até o dia do tratamento.
- Período de convalescença (dia 33 em diante). Dia 1 após o tratamento até o hematócrito alcançar o limite superior de 26%.

Bastos (2009), utilizando a mesma cepa do presente experimento, porém com uma carga infectante mais elevada ( $5 \times 10^7$ ) encontrou um período de incubação médio de 13 dias. Possivelmente, a diferença encontrada entre o PI do presente trabalho (20 dias) e o observado por Bastos et al. (2009) (13 dias) deve-se a diferença na dose de desafio utilizada ( $3 \times 10^5$  e  $5 \times 10^7$  respectivamente), uma vez que a cepa utilizada foi a mesma (UFMG 2) bem como as condições experimentais. Nas duas situações foram utilizados bezerros oriundos da mesma propriedade e da mesma raça assim como a maneira de criação e tempo para o desafio. Estes resultados condizem com o descrito por Kocan et al., (2003), que concluíram que o período de incubação da anaplasiose

dependente do número de organismos da dose infectante. No entanto, Gale et al., (1996), utilizando doses  $10^{10}$  (7,3 dias de PI),  $10^8$  (13,9 dias de PI) e  $10^6$  (19,9 dias de PI) corpúsculos de *A. marginale* para desafiar os animais, e Rodríguez et al., (2000) utilizando doses de desafio de  $1 \times 10^8$ , não encontraram diferença estatística em relação ao período de incubação, resultados estes, que possivelmente podem ser atribuídos as altas doses utilizadas para o desafio dos animais.

Em experimento semelhante, Kocan et al., (2001), não encontraram diferença ( $p > 0,05$ ), entre o período de incubação do grupo vacinado com vacina inativada produzida por cultivo celular e o grupo não vacinado.

O período de patência médio observado foi de 11,7 dias (tempo entre o início da parasitemia e o dia em que o hematócrito atingiu o valor de 10%). Possivelmente, isto se deve a carga de desafio ( $3 \times 10^5$ ), considerada alta e virulência da amostra utilizada. A cepa UFMG 2 (Genbank access number EU676175) é uma amostra de *A. marginale* sem apêndice, considerada de alta patogenicidade (Bastos et al., 2009). Esta autora encontrou período patência de 14 dias, trabalhando com a mesma amostra na dose de  $10^7$  corpúsculos de *A. marginale*.

O período de convalescença compreendeu o tempo após o tratamento (dia no qual o hematócrito dos animais atingiu 10%) até retornar a 26%, parâmetro mínimo considerado dentro da normalidade (26 a 42%) por Mayer et al., (1995). Como o acompanhamento do período de convalescença foi curto, a observação das ricketsemias e das oscilações de hematócrito até a sua estabilização foi influenciado pelo tratamento terapêutico realizado. Isso explica os valores baixos para o período de convalescença observado na tabela 3.

### 5.3. Avaliação da Parasitemia

Uma vez que não foram observadas diferenças entre os grupos para a duração de PI, PP, e de convalescença, o comportamento da doença será analisado considerando como dia zero aquele de menor volume globular e alinhando os dias para cada animal em relação a esse dia.

A citometria de fluxo foi realizada em intervalos diferentes das outras variáveis e, portanto, os dados serão apresentados na sequência das coletas, sem a correção acima.

#### 5.3.1. Esfregaço de sangue

Não houve efeito de tratamento sobre a resposta parasitemia, aferida por esfregaço de sangue, independente dos grupos. Quando foram analisadas as médias dos grupos em relação aos tempos, foi observada diferença ( $p < 0,05$ ) entre os dias.

No presente trabalho os valores médios máximos observados para a parasitemia foram 12,8% e 18,18% (através da utilização de esfregaços sanguíneos e citometria de fluxo, respectivamente), valores muito acima dos encontrados na infecção natural (Keiser et al., 1990) (Tabela 4 e 5)

Quando analisa a parasitemia ao longo dos dias (-7 a 12), dias estes compreendidos pelos períodos de patência e de convalescença, passando pelo dia 0 (dia de menor hematócrito), observa-se um comportamento inicialmente ascendente, onde esta sobe até o limite máximo um dia dia antes do valor mínimo de hematócrito, tomando uma direção descendente até os limites basais logo em seguida. Durante este mesmo período, também ocorre o aumento de outras variáveis como FC, FR e TR. Esta queda abrupta dos valores da parasitemia se deve ao fato de todos os animais, com exceção de dois, terem sido tratados para evitar a morte no dia 0 (Figura 8).

O comportamento da parasitemia seguiu o curso normal da doença, tendo a forma da curva, sendo influenciada pelo tratamento no dia 0. Caso estes não fossem tratados e não viessem a óbito, o declive da curva seria de maneira mais suave e prolongada.

Segundo os dados apresentados pela Tabela 4, não houve efeito de tratamento sobre a resposta parasitemia pelo esfregaço de sangue, independente dos grupos.

Tabela 4. Valores médios da parasitemia (%), medida através de esfregaços de sangue, em função dos dias e dos tratamentos de bezerros desafiados com corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ), cepa UFMG2, após protocolo de vacinação

Grupos	Dias												Média								
	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5		6	7	8	9	10	11	12	
1	0,8	1,4	5,8	8,7	10,2	7,4	8,9	4,0	0,3	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5 <sup>A</sup>
2	0,7	2,7	5,6	11,0	12,0	13,2	4,4	2,9	1,1	0,4	0,4	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,2	0,1	0,8	0,8	2,9 <sup>A</sup>
3	0,8	1,5	3,3	7,6	10,3	12,6	14,9	4,4	3,0	1,2	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	3,2 <sup>A</sup>
4	0,1	2,7	3,5	9,2	8,2	10,3	10,4	4,6	0,9	0,5	0,1	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8 <sup>A</sup>
Média	0,60 <sup>dc</sup>	2,07 <sup>cdc</sup>	4,54 <sup>abc</sup>	9,16 <sup>ab</sup>	10,17 <sup>ab</sup>	10,89 <sup>a</sup>	9,64 <sup>ab</sup>	4,01 <sup>abc</sup>	1,31 <sup>bcdc</sup>	0,68 <sup>bcdc</sup>	0,16 <sup>dc</sup>	0,51 <sup>dc</sup>	0,02 <sup>c</sup>	0,04 <sup>dc</sup>	0,01 <sup>dc</sup>	0,03 <sup>dc</sup>	0,07 <sup>dc</sup>	0,07 <sup>dc</sup>	0,21 <sup>dc</sup>		

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, são estatisticamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ).

Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso

Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante)

Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina

Grupo 4: solução salina + solução oleosa

Dia 0: dia de menor hematócrito

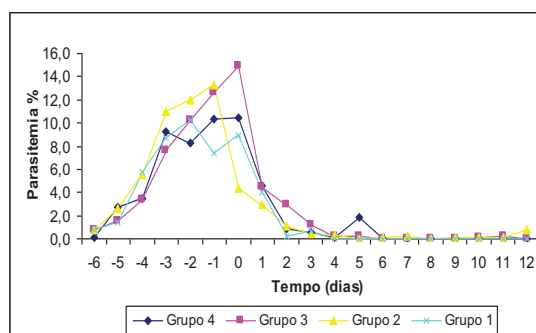


Figura 8. Comportamento dos valores médios da parasitemia medida por esfregaço de sangue no período de patência e de convalescença, na anaplasmose induzida pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB ( $n=20$ ), com 6 meses de idade. (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Alinhamento de dados tendo o dia zero o de menor hematócrito. Belo Horizonte, 2010.

### 5.3.2. Citometria de fluxo

A análise da parasitemia aferida por citometria de fluxo foi realizada semanalmente, enquanto a por esfregaço de sangue foi realizada diariamente.

Não houve efeito de tratamento sobre a resposta parasitemia, aferida por citometria de fluxo, independente dos grupos. Quando se comparou cada grupo isoladamente em relação aos dias, pode ser observada diferença ( $p < 0,05$ ).

Ao analisar o grupo 1, observa-se parasitemia elevada em relação a outros dias no período compreendido entre os dias 29 e 36 pós inoculação e em seguida nota-se uma queda no valor dos mesmos. No grupo 2, este aumento deu-se início no dia 27, permanecendo elevado até o dia 36. No grupo 3, a elevação foi mais tardia em relação aos grupos anteriores, permanecendo num nível mais elevado durante os dias 31 a 36, decrescendo logo em seguida. O último grupo apresentou o maior valor de parasitemia nos dias 34 a 36.

Os dados da tabela 5 demonstram que não houve efeito dos tratamentos sobre a resposta parasitemia mensurada através da citometria de fluxo, independente dos grupos.

A parasitemia sai do valor zero no dia 17 e alcança seu valor máximo nos dias 35 e 36, condizendo com o valor mais baixo do hematócrito, o que demonstra que estas duas

variáveis apresentam uma correlação negativa. Após alcançar o seu pico, a parasitemia decresceu a níveis basais (aproximadamente 3%). O tratamento foi realizado quando o hematócrito atingiu 10%. Nesta ocasião as parasitemias estavam no pico ou próximo dele (Figura 9).

Tabela 5. Valores do percentual de parasitemia medida por citometria de fluxo em função dos dias e dos tratamentos de bezerros desafiados com corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ), cepa UFMG2, após protocolo de vacinação

Grupos	Dias											mediana
	7	14	17	20	23	27	29	31	34	36	38	
1	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,22 <sup>ab</sup>	0,29 <sup>ab</sup>	0,64 <sup>ab</sup>	5,16 <sup>ab</sup>	8,80 <sup>bc</sup>	13,08 <sup>bc</sup>	9,09 <sup>bc</sup>	8,63 <sup>bc</sup>	2,51 <sup>ab</sup>	0,64 <sup>A</sup>
2	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,25 <sup>ab</sup>	0,24 <sup>ab</sup>	0,63 <sup>ab</sup>	5,74 <sup>bc</sup>	13,25 <sup>bc</sup>	17,24 <sup>bc</sup>	12,64 <sup>bc</sup>	22,29 <sup>bc</sup>	4,20 <sup>ab</sup>	2,04 <sup>A</sup>
3	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,23 <sup>ab</sup>	0,29 <sup>ab</sup>	0,50 <sup>ab</sup>	3,80 <sup>ab</sup>	14,13 <sup>ab</sup>	23,21 <sup>bc</sup>	33,32 <sup>bc</sup>	27,45 <sup>bc</sup>	4,65 <sup>ab</sup>	1,71 <sup>A</sup>
4	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,36 <sup>ab</sup>	0,29 <sup>ab</sup>	0,55 <sup>ab</sup>	2,00 <sup>ab</sup>	10,01 <sup>ab</sup>	15,48 <sup>ab</sup>	13,53 <sup>bc</sup>	11,44 <sup>bc</sup>	4,65 <sup>ab</sup>	0,68 <sup>A</sup>

Medianas seguidas de letras iguais, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha são estatisticamente semelhantes pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ )

Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso

Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante)

Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina

Grupo 4: solução salina + solução oleosa.

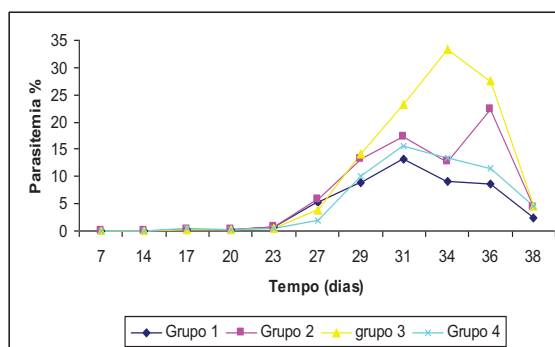


Figura 9. Comportamento dos valores médios da parasitemia medida por citometria de fluxo na anaplasmose, nos períodos de patência e de convalescença induzida pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ), cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB ( $n=20$ ), com 6 meses de idade. (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Belo Horizonte, 2010.

Não foi observado efeito da vacinação sobre a parasitemia aferida pelo método de esfregaço sanguíneo e citometria de fluxo. Estes resultados diferem dos encontrados por de la Fuente et al., (2002) que observaram que a utilização de vacina inativada produzida através da utilização de

cultivo de anaplasma em células IDE8, protegeu parcialmente contra a doença, sendo a ricketsemia menor ( $p \leq 0,05$ ) para os grupos vacinados, desafiados com a infestação artificial de carrapatos infectados. A ricketsemia máxima encontrada, através da leitura em citometria de fluxo, foi de

6,4%. No presente trabalho, a parasitemia alcançou valores mais altos do que os observados por de la Fuente et al., (2002a) e, este fato, possivelmente está relacionado às diferenças entre os métodos de desafio.

Kocan et al., (2001) encontraram uma resposta positiva para os animais vacinados com vacinas inativadas, uma vez que a parasitemia e a redução de VG foi significativamente menor no grupo vacinado. Porém, o experimento foi realizado com animais de 12 meses de idade, duas doses de vacinas com intervalos de 30 dias, uma dose de desafio três vezes menor ( $1 \times 10^5$ ) comparado com o atual experimento, e talvez a cepa utilizada para desafiar os animais (Virginia) não seja tão patogênica como a UFMG2.

A parasitemia observada no presente experimento seguiu o curso normal da doença, porém em um valor mais elevado, pois os animais foram inoculados experimentalmente e apresentaram valores que atingiram 33,32%, concordando com Blouin et al., (2002) que encontraram valores semelhantes (32%) após desafio com corpúsculos de anaplasma ( $3 \times 10^6$ ), 4 semanas após a última de quatro doses com intervalos de 21 dias. No experimento realizado por estes autores, todos os animais inoculados desenvolveram sinais clínicos de anaplasmoses, com o grupo vacinado apresentando 47,5% de redução de VG e o grupo controle 62% e período de incubação de 25,5 e 22,5 dias respectivamente, podendo os pesquisadores concluir que a vacinação com a vacina inativada produzida através do cultivo celular em células IDE8 induz forte resposta humoral, mas esta resposta não foi efetiva para controlar a doença, indicando que altos títulos de anticorpos, nem sempre irá proteger o animal da doença clínica.

É possível concluir que a vacinação não interferiu no número de animais enfermos após desafio, período de incubação, período

de patência e de convalescença e parasitemia, apesar da soroconversão ter ocorrido em todos os animais vacinados.

#### 5.4. Hematócrito

Não houve interação entre a parcela e a subparcela. Não houve efeito ( $p > 0,05$ ) de grupos sobre a resposta hematócrito, independente dos dias. Independente dos grupos ocorreu efeito ( $p \leq 0,05$ ) dos dias sobre a resposta hematócrito.

Durante o período analisado, dias -6 a 12, tempo este compreendido entre o período de patência e de convalescença, o grupo 1, o grupo 2, o grupo 3 e o grupo 4, apresentaram uma diminuição por igual nos valores dos hematócritos a partir do dia -6, chegando a um valor mínimo de 10% no dia zero, sendo este o dia de tratamento dos animais. Após este dia, no dia 1 o hematócrito iniciou sua recuperação, atingindo valores considerados normais por volta do dia 11. Quando se comparou as médias dos grupos, não observou diferença ( $p \geq 0,05$ ).

Dos cinco animais do grupo controle, três adoeceram e necessitaram de tratamento, considerando-se os mesmos índices de hematócrito apresentados anteriormente. Dois destes animais não precisaram ser tratados sendo que um deles chegou ao limite inferior de VG de 11% e no dia seguinte retornou para 18%. Após esta queda, seu volume globular (VG) não mais baixou. O outro animal manteve seu VG sempre dentro dos parâmetros considerados normais por Mayer et al., (1995). Dos quinze animais vacinados durante o experimento, treze necessitaram de tratamento após o desafio para prevenir a morte. Em condições naturais de campo, na maioria das vezes a doença ocorre de forma sub clínica, não necessitando de tratamento, sendo a forma clínica de manifestação esporádica (Oliveira et al., 1992).

Nos dias -4 à 10 os valores de hematócrito estão abaixo dos padrões normais em relação àqueles citados por Mayer et al., (1995), sendo, portanto, indicativos de anemia.

Antes do dia -6, período, considerado de incubação (ausência de doença clínica), os animais apresentavam a média de hematócrito dentro de limites normais, entre 30 e 35%. Com o decorrer da doença, os valores de hematócrito caíram, chegando ao limite mínimo no dia 0 (10%). Após este momento, o hematócrito voltou a subir, começando então o período de convalescença.

Como o período de monitoramento dos animais após o tratamento dos mesmos neste experimento foi curto (12 dias), não foi possível observar a variação dos valores de VG no decorrer dos dias. Os resultados encontrados por Coelho (2007), através do acompanhamento dos animais por um período de 75 dias após tratamento, demonstram que os valores de hematócrito observados nesse período não alcançam os valores demonstrados antes do desafio.

Analisando os dados de todos os animais independente dos grupos observou-se uma

relação entre o hematócrito e o tempo, durante o período patente e de convalescença, gerando uma equação de regressão ( $Y = 0,0202117 x^2 - 0,350404 x + 5,39084$ ) com  $r^2$  de 76,78% ( $p \leq 0,001$ ). Esta análise foi realizada utilizando-se a escala de tempo de 0 a 17, pois o programa utilizado para análise estatística não aceita números negativos. Desta forma, o tempo zero da regressão corresponde ao dia -6 (início do período patente) apresentado na tabela 6.

A equação de regressão do hematócrito foi feita em cima de dados transformados pela raiz do hematócrito, portanto, para saber o valor do mesmo em relação aos dias, deve-se elevar o resultado final ao quadrado. Por exemplo: Hematócrito no dia 11:

$$Y = 0,0202117 (11^2) - 0,350404 (11) + 5,39084 = 3,9$$

Portanto, pela equação, no dia 11 o HT seria 3,9. Entretanto o valor 3,9 é decorrente da transformação radicial dos dados originais. Desta forma, a resposta final deve ser elevada ao quadrado. Assim  $3,9^2 = 15,2$ . Portanto, no dia 11 o valor do HT seria 15,2%.

Tabela 6. Valores do hematócrito em função dos dias e dos tratamentos de bezerros desafiados com corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ), cepa UFMG2, após protocolo de vacinação

Grupos	Dias																Média		
	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10	11
1	27,3	26,5	24,8	19,3	15,7	13,3	10,5	12,8	14,0	16,0	17,0	18,8	20,4	21,6	21,6	22,2	23,5	25,3	19,5 <sup>A</sup>
2	28,8	26,7	21,7	19,3	15,7	14,0	10,3	11,7	15,0	16,8	18,3	18,2	20,2	21,7	22,5	22,8	24,7	25,5	19,7 <sup>A</sup>
3	28,2	26,7	24,7	19,5	17,3	13,3	9,8	11,7	11,5	13,7	14,5	15,2	16,3	18,0	20,2	21,0	21,7	21,6	18,0 <sup>A</sup>
4	27,4	25,6	22,0	20,4	19,2	16,2	13,6	16,2	16,8	18,4	20,6	22,4	21,5	22,8	25,0	24,3	26,3	26,8	21,4 <sup>A</sup>
Média	27,9	26,4	23,3	19,6	17,0	14,2	11,1	13,1	14,3	16,2	17,6	18,6	19,6	21,0	22,3	22,6	24,0	24,8	*

CV= 28,6%

\* Efeito quadrático significativo para a subparcela "dias" pelo teste F ( $p \leq 0,001$ )

<sup>A</sup> Médias semelhantes para o tratamento "grupos" pelo teste F ( $p > 0,05$ )

Variável transformada pela equação: raiz (variável) e modelo de regressão estimado através dos dados transformados. Entretanto, dados apresentados na tabela são os observados.

Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso

Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante)

Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina

Grupo 4: solução salina + solução oleosa

Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados.



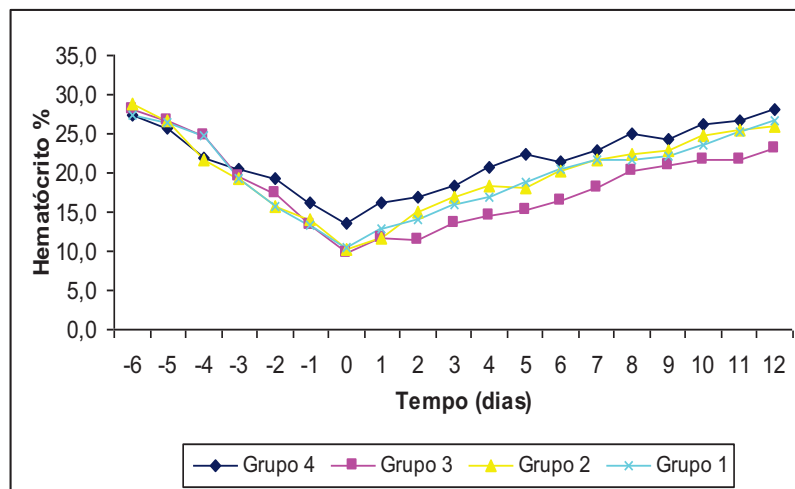


Figura 10. Comportamento dos valores médios do hematócrito na anaplasmosse, induzida pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ), cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade. (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados.

Belo Horizonte, 2010.

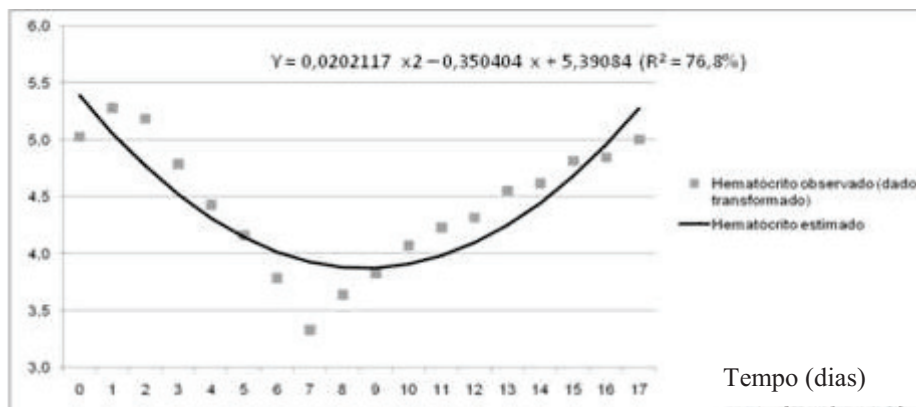


Figura 11: Análise de regressão do comportamento do hematócrito em relação ao tempo, durante períodos de patência e convalescença da anaplasmosse em bezerros (n=20) com 6 meses de idade, infectados experimentalmente com inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ), cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Belo horizonte, 2010.

Os resultados do presente experimento condizem com os encontrados por Gale et al., (1996) que, desafiando animais com diferentes quantidades de eritrócitos infectados, observaram que independente da carga infectante, todos os animais

apresentaram redução no volume globular, resultando em algum grau de anemia. Animais com VG abaixo de 15% foram tratados no trabalho de Gale et al., (1996), para evitar a morte.

Estes resultados diferem dos encontrados por Rodríguez et al., (2000) que observaram menores valores de hematócrito para o grupo controle em relação aos valores observados para os grupos vacinados ( $p \leq 0,01$ ), porém, os animais (mestiços) desafiados tinham 18 meses de idade e o desafio foi realizado com uma dose de  $5 \times 10^8$  corpúsculos de *A. marginale*, tendo como intervalo entre vacinações 21 dias (duas doses), e o desafio realizado 87 dias após a última vacinação. Kocan et al., (2001), após vacinar bezerros holandeses de 12 meses de idade com duas doses de vacinas com intervalo de 30 dias entre elas e desafiar após 10 semanas da última vacinação, com dose de  $1 \times 10^5$ , observaram que a queda do VG dos animais pertencentes ao grupo vacinado foi significativamente menor do que a do grupo controle, o que também

diferiu do presente experimento. Entretanto, estes autores utilizaram um desafio maior e menor respectivamente e um tempo maior entre a última dose da vacina e o desafio (87 dias e 10 semanas), tempo este que pode ter influenciado na construção de uma resposta humoral mais sólida pelos animais. Outra possibilidade pode ser a cepa utilizada para o desafio.

Os resultados de Blouin et al., (2002) também diferem do encontrado no presente trabalho, pois estes autores encontraram diferença ( $p \leq 0,05$ ) entre os grupos vacinados e controle para os valores de hematócrito, porém este autor, utilizou protocolo de vacinação com 4 doses intervaladas de 21 dias e desafio de  $3 \times 10^6$  corpúsculos de *A. marginale* 30 dias após a última vacinação.

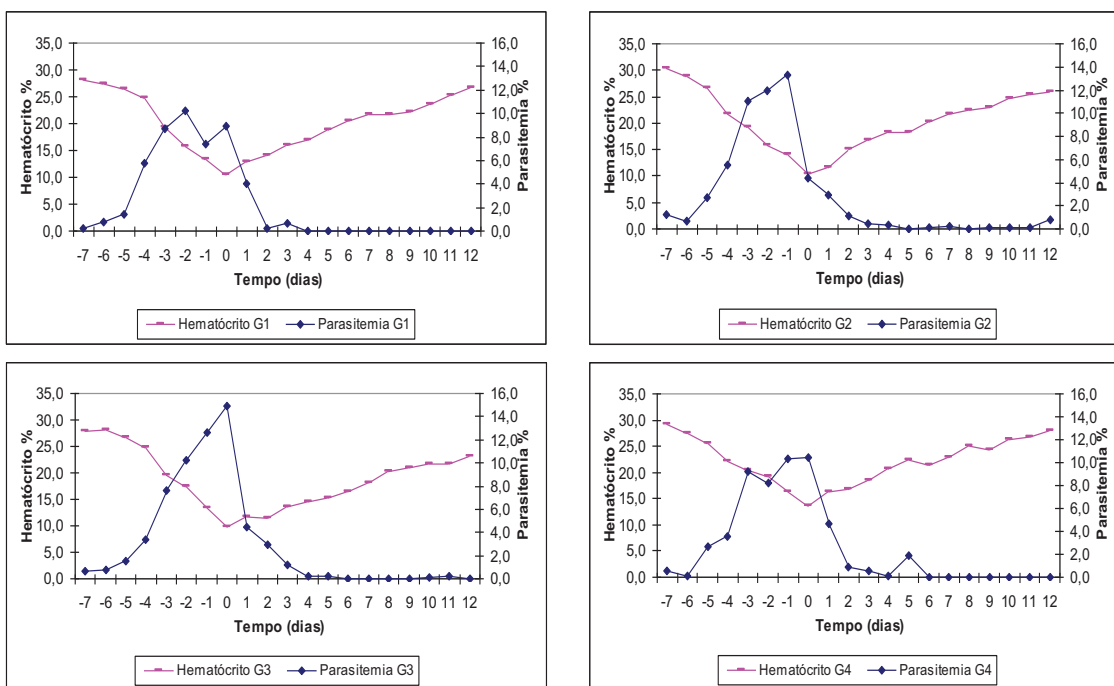


Figura 12. Comportamento dos valores do hematócrito e da parasitemia por esfregaço de sangue na anaplasmose no período de patência e de convalescença, em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados. Belo Horizonte, 2010.

## 5.5. Parâmetros clínicos

Embora os animais vacinados tenham soroconvertido, a intensidade da enfermidade não diferiu entre os tratamentos, sendo que todos eles apresentaram a mesma sintomatologia clínica do grupo não vacinado (anemia, inapetência, febre, constipação e letargia).

### 5.5.1. Frequência cardíaca e frequência respiratória

Após um PI de 20 dias, seguiu-se um PP com duração média de 11,7 dias. Assim, a partir do dia 21, todos os animais apresentavam certo grau de doença clínica como inapetência, febre, palidez de mucosas, fraqueza e icterícia, sintomas que também foram descritos por Coelho (2007), desafiando animais com a amostra UFMG2.

O comportamento da FC foi semelhante entre os quatro grupos ( $p > 0,05$ ). Todos os

grupos apresentaram efeito dos dias sobre os valores de FC ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 7).

Quando comparadas as médias entre o grupo 1, o grupo 2, o grupo 3 e o grupo 4, observa-se que o período em que ocorre o aumento da frequência cardíaca é o mesmo período em que se observam os menores valores de hematócrito, ou seja, o aumento da variável frequência cardíaca atua como um mecanismo de compensação na anemia (Coelho, 2007).

A partir do dia -6 até o dia 5, os valores de FC estão acima dos parâmetros normais (Dirksen et al., 1993), sendo o dia de maior elevação o mesmo dia de menor hematócrito, ou seja, o dia zero. Concomitantemente com a elevação do hematócrito, ocorre a diminuição e estabilização da FC. O comportamento foi o mesmo para todos os grupos.

Tabela 7. Valores da frequência cardíaca em função dos dias e dos tratamentos de bezerros desafiados com corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ), cepa UFMG2, após protocolo de vacinação

G	Dias																X		
	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10	11
1	99	95	102	102	114	121	127	123	123	112	105	101	95	83	104	98	115	108	107A
2	110	113	90	105	120	125	125	114	118	103	104	94	99	102	103	106	109	108	108A
3	108	113	102	98	104	114	124	122	122	107	116	117	105	97	95	96	106	118	109A
4	106	110	111	93	112	106	117	111	105	115	113	110	103	99	109	104	120	119	109A
X	105,44	107,8	101,1	99,28	112,4	116,4	123,1	117,4	116,9	109	109,4	105	100,5	95,13	102,6	101,1	112,6	113,1	*

CV= 20,9%

\* Efeito cúbico significativo para a subparcela "dias" pelo teste F ( $p \leq 0,05$ )

<sup>A</sup> Médias semelhantes para o tratamento "grupos" pelo teste F ( $p > 0,05$ )

Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso

Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante)

Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina

Grupo 4: solução salina + solução oleosa

Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados.

Ocorreu aumento das médias das frequências cardíacas após o desafio, quando comparadas com os valores apresentados por Dirksen et al. (1993) que consideram como normais para a categoria de bezerros jovens, de 60 a 100 bpm. Assim, quando comparadas com os valores propostos por estes autores, estas médias são elevadas e, segundo os mesmos autores, quaisquer valores acima dos citados são considerados sinal de disfunção cardíaca (taquicardia), por

doença ou na tentativa de compensar uma enfermidade. No dia -4, os bezerros já apresentavam algum grau de anemia que se agravou com o passar dos dias, sendo então este aumento de frequência cardíaca um mecanismo fisiológico do organismo na tentativa de compensar um menor aporte de oxigênio aos tecidos, uma vez que o sangue mais hidrêmico, como descrito por Losos (1986), tem uma capacidade menor de oxigenação de tecidos. (Tabela 7, Figura 13).

A frequência respiratória não variou seus valores entre os grupos ( $p>0,05$ ), no entanto quando se compara as médias entre tempos,

independente de tratamentos, pode ser observada diferença ( $p<0,05$ ) em relação aos dias. (Tabela 8, Figura 15).

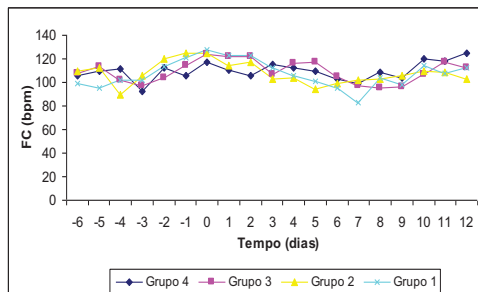


Figura 13. Comportamento dos valores médios da frequência cardíaca na anaplasmoze, no período de patência e de convalescência, induzida pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB ( $n=20$ ), com 6 meses de idade. (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados. Belo Horizonte, 2010.

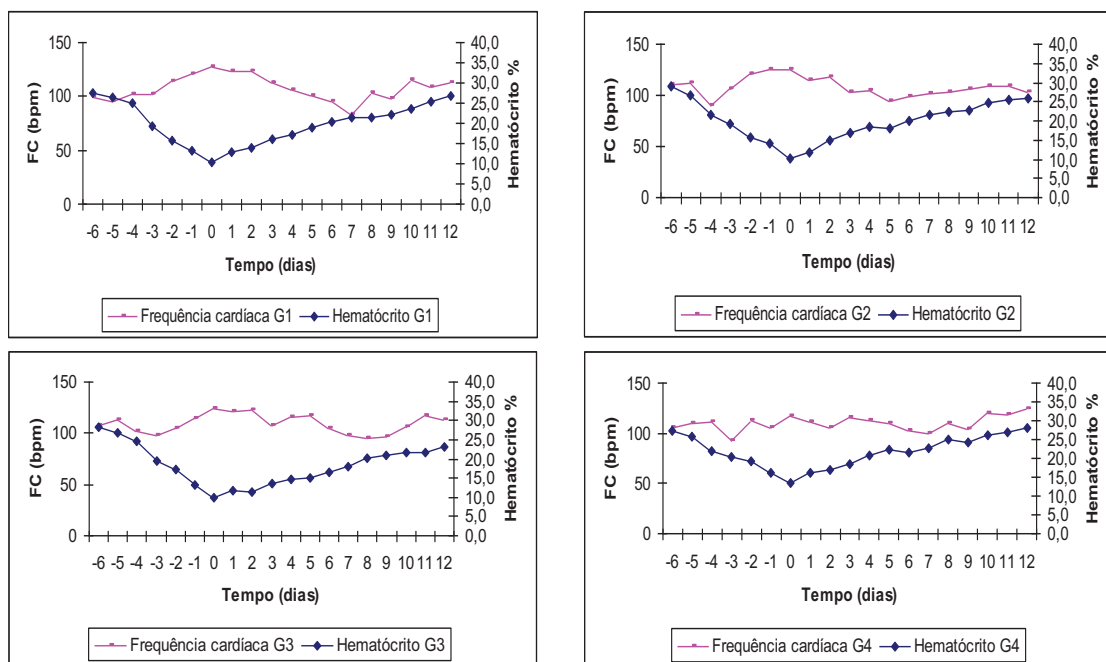


Figura 14. Comportamento dos valores da frequência cardíaca e do hematócrito na anaplasmoze no período de patência e de convalescência, em bezerros HPB ( $n=20$ ), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados. Belo Horizonte, 2010.

Tabela 8. Valores da frequência respiratória no período de patência e de convalescença em função dos dias e dos tratamentos de bezerros desafiados com corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ), cepa UFMG2, após protocolo de vacinação

Grupos	Dias												Média							
	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5		6	7	8	9	10	11	12
1	46	41	42	49	51	49	46	61	44	39	36	33	33	34	37	34	34	33	32	41 <sup>A</sup>
2	54	50	45	49	51	51	49	47	46	40	41	38	34	35	38	34	34	37	33	42 <sup>A</sup>
3	46	39	45	40	46	43	37	55	43	51	41	33	31	34	35	32	36	32	37	40 <sup>A</sup>
4	46	43	44	38	41	46	40	39	42	44	44	35	37	37	43	39	40	38	42	41 <sup>A</sup>
Média	48 <sup>a</sup>	43 <sup>abc</sup>	44 <sup>abc</sup>	44 <sup>abc</sup>	47 <sup>abc</sup>	47 <sup>ab</sup>	43 <sup>abc</sup>	50 <sup>a</sup>	44 <sup>abc</sup>	44 <sup>abc</sup>	40 <sup>abc</sup>	35 <sup>bc</sup>	34 <sup>c</sup>	35 <sup>bc</sup>	38 <sup>abc</sup>	34 <sup>bc</sup>	36 <sup>bc</sup>	35 <sup>bc</sup>	36 <sup>bc</sup>	

<sup>A,a</sup>Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, são diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ).

Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso

Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante)

Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina

Grupo 4: solução salina + solução oleosa

Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados.

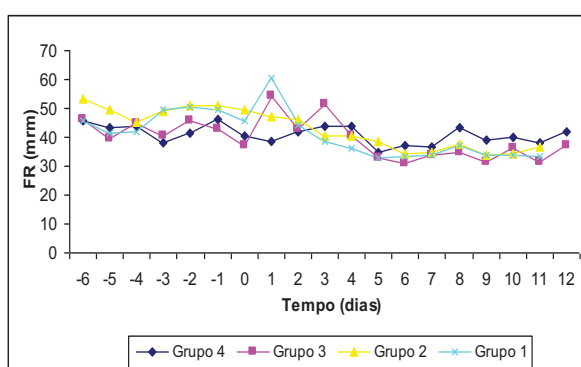


Figura 15. Comportamento dos valores médios da frequência respiratória na anaplasmosse no período de patência e de convalescença, induzida pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB ( $n=20$ ), com 6 meses de idade. (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados. Belo Horizonte, 2010.

A FR aumentou no dia -5 até o dia 4 com posterior queda destes valores no dias 5 em diante. Este aumento ocorreu no mesmo período da maior queda de hematócrito, sendo este, outro mecanismo para compensar os quadros de acidose metabólica (Coelho, 2007). Com a recuperação dos animais após o tratamento e posterior elevação do hematócrito a variável FR, apresentou a tendência em retornar aos parâmetros normais.

As médias dos valores de frequência respiratória, independente dos grupos, estão acima dos valores normais em relação aos postulados por Dirksen et al. (1993), que consideram como parâmetros normais valores de 30 a 45 movimentos para bezerros. Frequências respiratórias elevadas são descritas por Coelho. (2007) como mecanismos compensatórios em quadros de acidose metabólica na anaplasmosse. Este é o primeiro mecanismo utilizado na

compensação da acidose metabólica e, neste experimento, a frequência respiratória aumentou concomitantemente à queda do hematócrito com maiores valores imediatamente após o dia de anemia mais intensa (Cunningham, 2004). Este aumento de FR ocorre, entre outras situações, na redução da superfície alveolar respiratória dos pulmões, na insuficiência circulatória e nas anemias (Garry, 1994).

A análise dos dias indica que, no dia -4 todos os animais demonstravam certo grau de doença clínica. O aumento da frequência cardíaca e posteriormente da frequência respiratória, em resposta a anemia, foram relatados por Wanduragala e Ristic (1993), Radostits et al., (2002) e por Coelho (2007) como sinais clínicos presentes no quadro clínico da doença, concordando com os resultados encontrados no presente experimento.

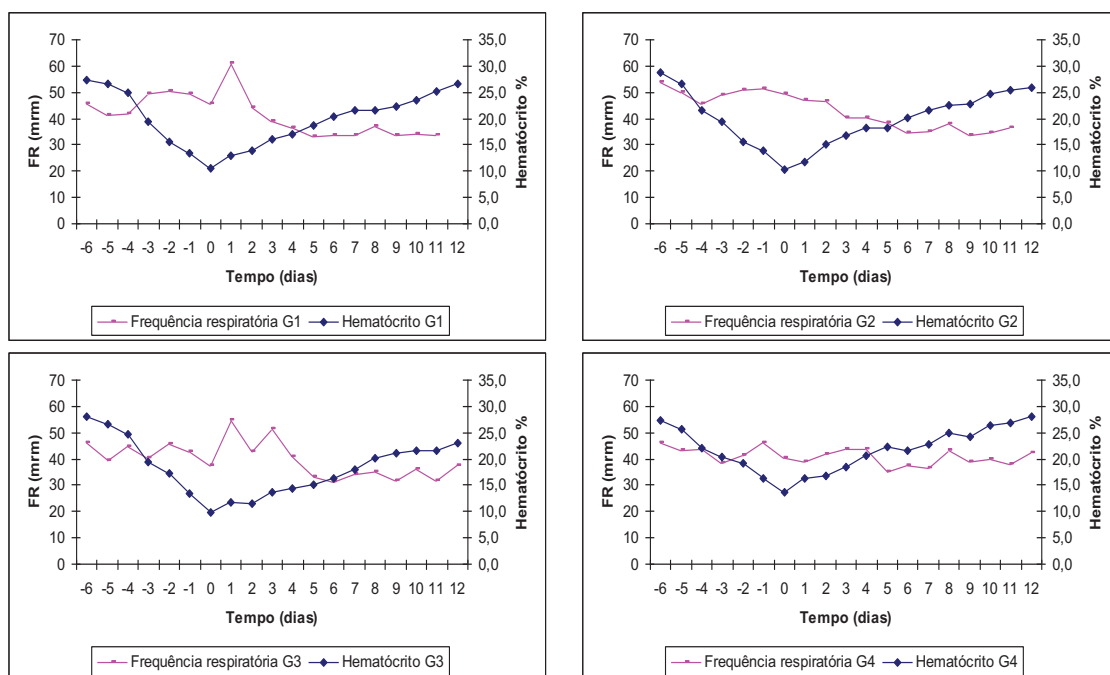


Figura 16. Comportamento dos valores da frequência respiratória do hematócrito no período de patência e de convalescença na anaplasmose, em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados. Belo Horizonte, 2010.

### 5.5.2. Temperatura retal

A temperatura retal não foi influenciada pelos tratamentos ( $p > 0,05$ ). Quando comparamos as médias em relação aos tempos, pode ser observada diferença ( $p < 0,05$ ) entre os dias.

Durante o período de incubação, a temperatura média dos animais estava entre 38,5 e 39,0°C e com a progressão da doença e queda de VG, ocorreu o aumento da TR, a qual alcançou seu limite máximo (40,7°C) no dia -1, ou seja, no dia de maior valor de parasitemia e elevação das frequências

circulatória e respiratória. É interessante observar que apesar de não ultrapassar os valores fisiológicos descritos por Dirksen., (1993), a temperatura começou a aumentar a partir do dia -5, atingindo valores acima do fisiológico a partir do dia -3 e retornando aos valores iniciais 2 dias após o tratamento com enrofloxacino. (Figura 17)

Segundo Janeway et al., (2001), a elevação da temperatura corporal, é mediada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), citocinas produzidas pelos macrófagos, que na anaplasiose apresenta papel fundamental na resposta á infecção (Araújo et al., 2003)

Um importante efeito dessas citocinas é sua ação sobre o hipotálamo, alterando a regulação da temperatura corporal, e sobre as células musculares e adiposas, alterando a

mobilização de energia para a elevação da temperatura. Em temperaturas elevadas, a replicação bacteriana e viral é reduzida, enquanto o processamento do antígeno é aumentado (Janeway et al., 2001).

Dirksen et al. (1993) consideram como parâmetros normais de temperatura retal de bovinos 38,5°C a 39,5°C para animais hígidos. A análise da Tabela nove e sua ilustração na Figura 11 demonstra que, do dia -4 até o dia 1, os valores de temperatura oscilaram acima dos parâmetros normais.

Gale et al. (1996), Rodríguez et al. (2000), Kocan et al. (2001), Blouin et al. (2002), de La Fuente et al. (2002), Kocan et al. (2003) e Coelho (2007), também relataram sinais de febre em seus experimentos com temperaturas acima de 40°C.

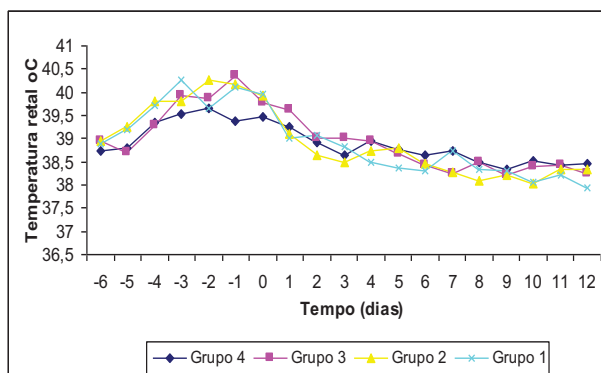


Figura 17. Comportamento dos valores médios da temperatura retal na anaplasiose no período de patência e convalescença, induzida pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade), em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade. (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa). Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados. Belo Horizonte, 2010.

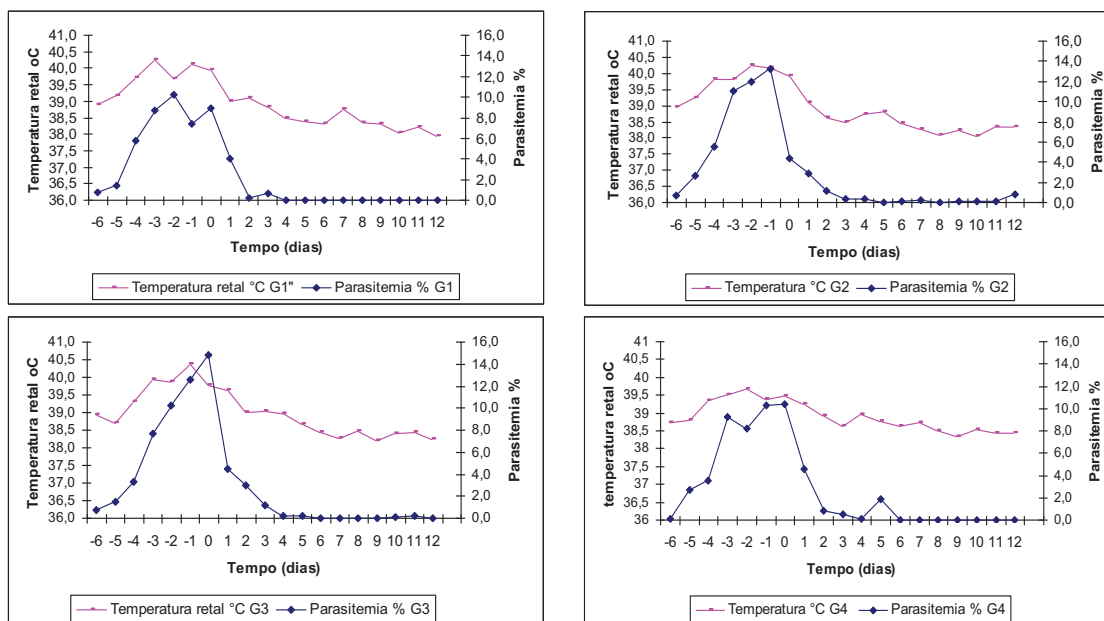


Figura 18. Comportamento dos valores da temperatura retal e da parasitemia na anaplasiose no período de patência e convalescença, em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados. Belo Horizonte, 2010.

Tabela 9. Valores da temperatura retal em função dos dias e dos tratamentos de bezerros desafiados com corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ), cepa UFMG2, após protocolo de vacinação

Grupos	Dias														Médias					
	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7		8	9	10	11	12
1	38,9	39,2	39,7	40,3	39,7	40,1	40,0	39,0	39,1	38,8	38,5	38,4	38,3	38,8	38,4	38,3	38,1	38,2	38,0	38,9 <sup>A</sup>
2	38,9	39,2	39,8	39,8	40,3	40,2	39,9	39,1	38,6	38,5	38,7	38,8	38,5	38,3	38,1	38,2	38,0	38,3	38,4	38,9 <sup>A</sup>
3	38,9	38,7	39,3	39,9	39,9	40,4	39,8	39,6	39,0	39,0	38,7	38,4	38,3	38,5	38,2	38,4	38,4	38,4	38,3	39,0 <sup>A</sup>
4	38,74	38,8	39,3	39,5	39,7	39,4	39,5	39,3	38,9	38,6	39,0	38,8	38,6	38,7	38,5	38,3	38,5	38,4	38,5	38,9 <sup>A</sup>
Médias	38,9 <sup>c</sup>	39,0 <sup>abcd</sup>	39,5 <sup>abc</sup>	39,9 <sup>ab</sup>	39,9 <sup>ab</sup>	40,4 <sup>a</sup>	39,8 <sup>ab</sup>	39,2 <sup>bcd</sup>	38,9 <sup>cd</sup>	38,7 <sup>de</sup>	38,8 <sup>de</sup>	38,6 <sup>de</sup>	38,5 <sup>de</sup>	38,5 <sup>e</sup>	38,4 <sup>e</sup>	38,3 <sup>e</sup>	38,3 <sup>e</sup>	38,3 <sup>e</sup>	38,3 <sup>e</sup>	38,3 <sup>e</sup>

A,a. Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúscula na linha, são estatisticamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ )

Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso

Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante)

Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina

Grupo 4: solução salina + solução oleosa

Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados.

## 5.6. Correlações

A análise de correlação entre as variáveis FC, FR, HT, CF e ES foi realizada considerando como o dia zero o do desafio com UFMG2. Assim os resultados

apresentados no anexo 3 compreendem o período patente e de convalescença.

A fase de anemia mais intensa se deu entre os dias 27 e 34



Ao analisar a tabela de correlação com os dados agrupados (anexo 3), observa-se que, a maior parte das mesmas, ocorrem durante o período patente, que é o período onde esta acontecendo as alterações clínicas tais como anemia e acidose metabólica.

Ao correlacionar-se FC com TR, se observa uma correlação mediana no dia 36 e 38 pós inoculação, e com a FR esta somente acontece no dia 38. Porém esta última variável apresenta uma correlação forte com a TR também no dia 38.

A temperatura retal apresenta uma correlação negativa com hematócrito no dia 27, que é quando este começa a cair, e nos dias 31 e 34, quando este está retornando a normalidade. Com a variável, esfregaço de sangue e citometria de fluxo, as correlações são nos dias 27 e 32 e 36 e 38, respectivamente.

O hematócrito apresentou forte correlação com o esfregaço de sangue (dias 27, 29 e 31) e com a citometria de fluxo (dias 27, 29, 31, 36 e 38).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente experimento embora tenha observado a soroconversão dos bezerros vacinados, esta não foi capaz de prevenir a doença clínica ou torná-la mais branda visto que todos os animais vacinados adoeceram clinicamente e apresentaram os mesmos sinais clínicos e mesmos PI, PP, PC apresentados pelo grupo controle.

A inabilidade dos altos títulos de anticorpos em prevenir a doença clínica não era esperada, e possivelmente foi atribuída a alta carga de desafio ( $3 \times 10^5$  corpúsculos de *A. marginale*), e à patogenicidade da cepa (UFMG2). Uma elevada carga de desafio e um período de incubação menor podem ser atribuídos ao modo de desafio. Um desafio com dose única, com alta concentração de

corpúsculos de uma cepa de alta patogenicidade, provavelmente não é a realidade das infecções naturais onde os animais são expostos a desafios em baixas concentrações diárias por períodos prolongados de tempo (Pacheco et al., 2004). A elevada patogenicidade da cepa utilizada para desafiar os animais (UFMG2), pode explicar os resultados contrários aos observados em experimentos anteriores, tais como Rodríguez et al., (2000), Kocan et al., (2001) e Blouin et al., (2002), nos quais a vacinação conseguiu minimizar os sinais clínicos da anaplasiose. A amostra utilizada por estes autores para o desafio dos animais pode não ter sido tão patogênica quanto à utilizada no presente experimento.

As correlações entre as variáveis estudadas e os dias de patência apresentaram-se significativas, porém com um número reduzido de animais. A significância das correlações seria mais confiável se o presente experimento possuísse um número maior de repetições (bezerros).

Portanto, é necessário que se faça outras situações experimentais com a mesma vacina utilizada neste experimento, porém desafiando-se os animais com outras amostras de *A. marginale* ou desafiando com doses menores da mesma cepa. Outra possibilidade seria a realização de um experimento utilizando-se a mesma vacina no campo, onde o desafio seria feito de forma mais lenta e em doses menores, tendo assim um maior período para o animal modular a construção de uma resposta imune.

## 7. CONCLUSÃO

As vacinas inativadas, obtidas a partir do cultivo de *A. marginale* em células embrionárias de carrapatos *Ixodes scapularis*:

Induzem soroconversão em animais vacinados.

Não foram efetivas na prevenção da anaplasmosose ao desafio com UFMG2, não sendo capazes de inibir o aparecimento da sintomatologia clínica apresentada pelos animais, nas condições do presente experimento.

Em relação ao desafio experimental dos animais, são necessários maiores estudos relativos à maneira com que estes são conduzidos, simulando a infecção natural.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia Celular e Molecular*. 5.ed.Rio de Janeiro. Elsevier. 2005.580p.
- ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; SOARES, C.O. et al. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Brás.*v.23(4).p.139-148.2003.
- ARTECHE, C.C.P. Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil. Uso de cepas atenuadas de *Babesia* spp e de cepa heteróloga de *Anaplasma*. *Hora Veterinária*. v.11.n. 66. p. 39-42. 1992.
- ARTILES, J. ALVES-BRANCO, F.P.J.; MARTINS, J.R.. Prevalência de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* no município de Bagé, RS. *Ver. Bra. Parasito. Vet.*v.4.p.179.1995.
- BARROS, L.S.; MADRUGA, R.C.; ARAÚJO, F.R. et al. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-aridregion of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. v.100. n.6. p.513-517. 2005.
- BASTOS, C.V.; PASSOS, L.M.F.; VASCONCELOS, M.M.C. et al. In vitro establishment and propagation of a Brazilian strain of *Anaplasma marginale* with appendage in IDE8 (*Ixodes scapularis*) cells. *Braz. Jour. Micro.* v.40. p.399-403. 2007
- 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. Jour.* doi:10.1016/j.tvjl. 2009.
- BAUMGARTENER, W.; STOGER, J.; MARKTL, W. Demonstration of the oral path of infection with *Anaplasma marginale* in calves. *Vet. Rec.* v.17.n.133.p.64-66. 1993.
- BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmatacea) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari:Ixodidae) cell. *J.Med.Entomol.* v.35. p.788-797. 1998.
- BLOUIN, E.F; SALIKI, J.T; KOCAN, K.M. et al. Evaluation of *Anaplasma marginale* from tick cell culture as an immunogen for cattle. *Ann. New York Acad. Scie.* v.849. p.253-257. 2002.
- BOCK, R.E.; VOS, A.J. Immunity following use of australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aus. Vet. Jou.* v. 79. p. 832-839. 2001.
- BOLETIM BRASILEIRO DE AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIAS EM SAÚDE. Ano II, n. 3, 2007. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/brats/BRATS3glsrio.pdf>. Acesso em 17 de julho de 2010.
- BRADLEY, G.C .; FRIEDBERG, C.R. Autoimmune Hemolytic Anemia. *Am. Jour. Hemat.* v.69. p. 258-271. 2002.
- 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. *Infec. Imm.*v.66.p.5406-5413.1998.
- BUENING, G.M. Cell-mediated immuneresponses in calves with anaplasmosis. *Am.J. Vet. Res.* v.34, n.6, p.757-763, 1973.
- CAMARRILO, S.D.R.; ORTIZ, M.A.G.; ALACRÓN, G.J.C. et al. Ensayo de um imunogeno experimental inactivado contra *Anaplasma marginale*. *Técnica Pecuária em México*.v.37. n.1.p. 1-13. 1999.
- CARNEIRO, R.A.; LEME, F.O.P.; PAES, P.R.O. *Hematologia dos animais domésticos*. Belo Horizonte. Ed. FEPMV. 2009. p. 35-40.
- COELHO, L. C.T. *Anaplasmosse bovina: parâmetros clínicos e de patologia clínica em bezerros infectados experimentalmente*. 2007.p.65f. Dissertação de mestrado em Clínica e Cirurgia da Escola de veterinária da UFMG.
- CUNNIGHAM, J.G.. *Tratado de fisiologia veterinária*. 3ªed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 454p.
- DARLINGTON, P.B.. Anaplasmosis in cattle (Galziete) found to exist in Kansas. *National American Veterinary*. v.7. p.39-41. 1926.
- DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F. et al. Infections of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of intracelular ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with another genotypes. *Linival and diagnostic laboratory immunology*. v.9. p. 658-668. 2002a.
- DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F. et al. Vaccination of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks. *Veterinary Microbiology*. v. 89. p. 239-251. 2002b.
- 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: ExameClínico dos Bovinos*. 3ª Ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan S.A, 1993, 419p..
- DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and *He* agents as subjective synonymus of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syc. Evo. Microbiol* .v.51.p.2145-2165.2001.
- ERIKS, I.S.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C. et al.. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* in carrier cattle using a nucleic acid probe. *J. Clin. Microbiol*. v.27.p.279-284.1989.
- GALE, K.R.; LEATCH, A.J.; DEVOS, A.J. *Anaplasma marginale*: Effect of Challenge of Cattle with Varying Doses of Infected Erythrocytes. *International Journal of Parasitology* .v.26. n.96.p.1417-1420. 1996.
- FIGUEROA MILLÁN, J.V.; CANTÓ ALRCÓN, G.J.; RAMOS ARAGÓN, J.A. et al. Evaluación em condiciones de campo da

- La vacuna inactivada de *Anaplasma marginale* denominada Pazvax. *Vet. Mex.* v. 30. n. 3. p.221-229. 1999.
- GARRY, F.B.. Indigestão em Ruminantes. In: Smith, B.P.. *Tratado de Medicina de Grandes Animais*. São Paulo: MIR Assessoria Editorial. 1994. p.750-783.
- GE, N.L.; KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adult using non radioactive *in situ* hybridization. *J. Med. Entomol.* v. 33. p.911-920.1996.
- GRAFIAS, C.R.B.; ALVA, G.P.; AZOULAY, Y.R. et al. Estudio de la respuesta inmune humoral y celular en la infección y reinfección experimental de bovinos con *Anaplasma marginale*. *Vet. Méx.*, v.34, n.3, p.247-259, 2003.
- GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitology.* v.57.p.109-119.1995.
- GRAY, D.W.; MORRIS, P.J. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of langerhans. *Stain tech.* v.62. p.373-381. 1987.
- HART, L.T.; LARSON, A.D.; DECKER, J.L. Preparation of an intact *Anaplasma marginale* devoid of host cell antigen. *Curr. Microbiol.*v.5. p.95-100. 1981.
- HART, L.T.; TODD, W.J.; LUTHER, D.G. et al. Progress toward an improved vaccine for anaplasmosis. *Louisiana Agriculture.* v.31. p.3-6. 1987
- HENRY, E.T.; NORMAN, B.B.; FLY, D.E. et al. Effects and use of modified live *Anaplasma marginale* vaccine in beef heifers in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.183. p.66-69. 1983.
- HORNEF, M.W.; WICK, M.J.; RHEN, M. et al. Bacteria strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology.*v.3.p.1033-1040.2002.
- JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Basic concepts in immunology. Immunology: the immune system in health and disease*. Porto Alegre.5.ed. Artmed. p.1-34. 2001.
- KEISER, S.T.; ERIKS, I.S.; PALMER, G.H.. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection on cattle. *Infect. Immun.* v.58.n.4.p.117-119.1990.
- KESSLER, R.E.; SASTRE, A.M.; MOREIRA, M.A. et al. Experiências com vacunas vivas atenuadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* y *A. centrale* conservadas por congelación em Brasil. *Rvta. Cub. Cienc. Vet.*v.22n.3.p.189-196.1991.
- KESSLER, R.H.; SACCO, A.M.S.; MADRUGA, C.R. et al. Teste crítico de vacinas atenuadas de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em novilhas da raça holandesa. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v.7. n.1. p.1-5. 1998
- KOCAN, K.M. Development of *Anaplasma marginale* in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. In: Sauer, J. R.; Hair J. A (ed.), *Morphology, physiology and behavioral ecology of ticks*. Ellis Horwood Ltd, Chichester, United Kingdom.1986. p.472-505.
- KOCAN, K.M.; GOFF, W.L.; STILLER, D. et al. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni*(Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to

- susceptible cattle. *J. Med. Entomol.* v. 29. p.657–668. 1992a
- KOCAN, K.M.; GOFF, W.L.; STILLER, D. et al. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from infected to susceptible cattle. *Am. J. Vet. Res.* v.53. p.499–507.1992b.
- KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.; BARBET, A.F. Anaplasmosis control. Past, present and future. *Ann. NY. Acad. Sci.* v.916.p.501-509.2000.
- KOCAN, K.M.; HALBUR, T.; BLUIN, E.F. et al. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Veterinary Parasitology.* v. 102. n.129. p. 151-161.2001.
- KOCAN, K.M.; DE LA FUENT, F.J.; GUGLIELMONE, A. et al. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews.* v.16.n.4.p.698-712.2003.
- KOCAN, K.M.; DE LA FUENT, F.J.; BLOUIN, E.F. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology.* v.167. p. 95-107. 2010.
- KURZ, M.W. *Nutritional Modulation of Immunity and Physiological Responses in Beef Calves.* 2004.120f. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Masters of Science. Texas A&M University.
- KUTTLER, K.L; TODOROVIC, R.A. The techniques of preimmunization for the control of Anaplasmosis. In: Jones, E. W.(Ed). *Proceedings of the 6th National Anaplasmosis Conference, Las Vegas, NV.* 1973. p. 106-112.
- KUTTLER, K.L.; ZAUGG, J.L.; JOHNSON, L.W. Serologic and clinical responses of preimmunized, vaccinated, and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. *Am. J. Vet. Res.* v. 45. n. 11. p. 2223-2230.1984.
- LOSOS, G.J. Rickettsial disease-Anaplasmosis. In: *Infectious Tropical Disease of Domestic Animals.* New York: Churchill Livingstone Inc 1986.p742-795.
- MADRUGA, C.R.; GOMES, R.F.; SCHENK, M.A.M. *Etiologia de algumas doenças de bezerras de corte no estado de Mato Grosso do Sul.* Campo Grande, MS : Embrapa-CNPGC, 1984. 27p. (Circular Técnica, 15).
- MCGAREY, D.J.; ALLRED, D.J. Characterization of Hemagglutinating Components on the *Anaplasma marginale* Initial Body Surface and Identification of Possible Adhesins. *Infection and Immunity.* v.62.n.10.p.4587-4593.1994.
- MCCORKLE-SHIRLEY, S.; HART, L.T.; LARSON, A.D. et al. High-yield preparation of purified *Anaplasma marginale* from infected bovine red blood cells. *Am. J. Vet. Res.* v. 46. p. 1745-1747.1985.
- MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. *Medicina de laboratório veterinária – Interpretação e diagnóstico.* São Paulo: Roca LTDA, 308p. 1995.
- MORETTA, R.; RUYBAL, P.; MASPLET, M. et al. Flow Cytometry to Evaluate *Anaplasma marginale* Parasitemia Using a Fluorescent Nucleic Acid Strain. *Animal biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N. Y. Academy of Sciences.* v. 1149. p. 111-113. 2008.
- MOLAD, T.; MAZUZ, M.L.; FLEIDEROVITZ, L. et al. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale*-infected cattle grazing within an

- endemic area. *Vet. Microbiol.* v.113. p.55-62. 2006.
- MONTENEGRO, S.; JAMES, M.A.; BENITEZ, M.T. et al. Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as vaccines against anaplasmosis. *Parasitol. Res.* v.77.p.93-101.1991.
- MUNDERLOH, U.G; WANG, Y.L.M; CHEN, C; KURTTI, T.J. Establishment, maintenance and description of cell lines from tick *Ixodes scapularis*. *J. Parasitol.* v. 80. p.533-543. 1994.
- OLIVEIRA, A.A.; PEDREIRA, P.A.S.; ALMEIDA, M. F. R. S.; Doença de bezerros II. Epidemiologia da anaplasmosose no estado do Sergipe. *Arq. Bra. Med. Vet. Zootec.* v.44. p.377-386. 1992.
- PASSOS, L.M.F.; LIMA, J.D. Anaplasmosose congênita em Minas Gerais. *Ar. Bras. Med. Vet.*v.36.p.743-744
- PALMER, G.H; BARBET, A.F.; KUTLER, K.L .et al. Detection of an *Anaplasma marginale* common surface protein present in all stages of infection. *J. Clin. Microbiol.* v. 23.n.11.p.1078-1083.1986.
- PALMER, G.H.; RURANGIRWA, F.R.; KOCAN, M.K. et al. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol. Today* v. 15. p. 253–300.1999.
- PALMER, G.H. The highest priority: what microbial genomes are telling us about immunity. *Vet. Immunol.* v.85. n.12. p.1-8.2002.
- PAYNE, R.C.; OSORIO. O.; YBANES, A. Tick-borne diseases of cattle in Paraguay. II. Immunization against anaplasmosis and babesioses. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*v.22.p.101-108.1990.
- POTGIETER, F.T.; VAN RENSBURG, L. The effect of incubation and prefeeding of infected *Rhipicephalus simus* nymphae and adults on the transmission of *Anaplasma marginale*. *J. Vet. Res.*v. 49.p. 99-101.1983.
- RADOSTITTS, O.M.; GAY, C.C.;BLOOD, D.C. et al. *MedicinaVeterinária: Tratado de Doenças dosBovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Eqüinos.* 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.2002.1737p.
- RIBEIRO, M.F.B.; REIS, R. 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.; SALCEDO, J.H.P., SANTOS, J.L. et al. Inquérito de opinião com criadores da Zona da Mata do estado de Minas Gerais: I. Alguns fatores associados com mortalidade de bezerros. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.35. p.547-556. 1983.
- RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D.; GUIMARÃES, A.M. et al. Transmissão congênita da anaplasmosose bovina. *Arq.Bras. Med. Vet. Zoot.* v.47. n.3. 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, p. 31-39, 1996.
- RIBEIRO, M.F.B.; PASSOS, L.M.F; GUIMARÃES, A.M.. Ultrastructure of *Anaplasma marginale* with an inclusion appendage, isolated in Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* v. 70. p. 271-277. 1997.
- RICHEY. E.J. Bovine anaplasmosis. In: Howard, J.R (ed) *Current veterinary therapy food animal practice.* Philadelphia: The W.B. Saunders Co.1981.p.767-772.
- RISTIC, M. Anaplasmosis. *Adv. Vet. Sci.* v.6.p.111-192.1960.

- RODRIGUEZ, S.D.; GARCÍA ORTIZ, M.A.; HERNANDEZ SALGADO, G. et al. *Anaplasma marginale* inactivates vaccine: dose titration against a homologous challenge. *Com. Immu. Micro. & Infe. Dis.* v. 23, p. 239-252, 2000.
- SALIKI, J.T.; BLOIUN, E.F.; RODGERS, S.J. et al. Use of a tick cell culture-derived *Anaplasma marginale* antigen in a competitive ELISA for serodiagnosis of anaplasmosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 849. p. 273-281.1998.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação animal*. 3.ed. Belo horizonte: FEPMVZ. 264p. 2007.
- SMITH. K.; KILBORNE, F.L. Investigations into the nature, causation and prevention of southern cattle fever. *Am. Rep. Bur.* p. 177.1923.
- SHKAP, V.; BRAYTON, K.; BROWN, W.C. Expression of major surface protein 2 variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma central* vaccinates. *Infec. Immun.* v. 70. p. 642-648.2002.
- SOUZA, J. C. P.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L. 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.; MASSARD, C.L. Prevalence of Antibodies against *Anaplasma Marginale* (rickettsiales: anaplasmataceae) in Cattle in the "Médio Paraíba" mesoregion. Brazil. *Ciência Rural.* v.31. n.2. p.309-314. 2001.
- TABELE, N.; PALMER, G.H. Crossprotective immunity between the Florida and the Zinbabwe stock of antigens of *Anaplasma marginale*. *Trop. Anim. Hthl. Prod.* v.23.p.197-202.1991.
- THEILER, A. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. In: Report of the Director of Veterinary Research, Departament of Agriculture of the Union South Africa[s,l].1910. p.7-46.
- TIZARD, I. *Veterinary Immunology*. New York.2000.
- UNDERWOOD, W.J. Rumen Latic Acidoses. Part II. Clinical sings, diagnosis, treatment and prevention. *Comp. Cont. ed Pratic Vet.* v.14, p.1265-1270. 1992.
- WANDURAGALA, Z.; RISTIC, M. Anaplasmosis. In: *Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals*. New York: Pergamon Press Inc.1993. 427p. p. 65-87.

## 9. ANEXOS

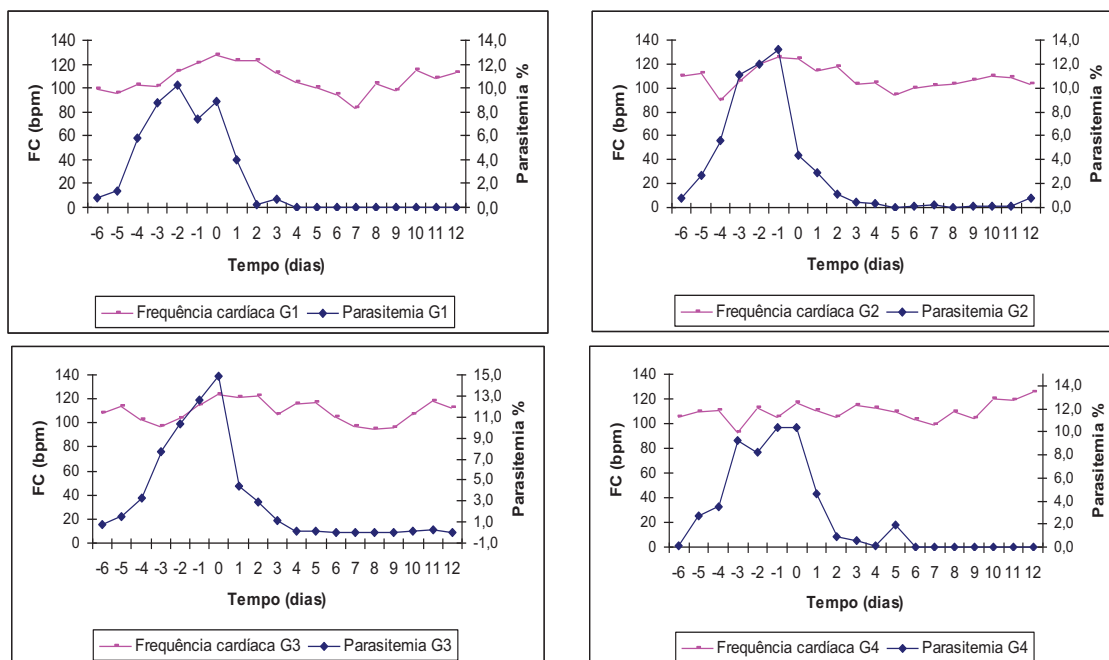


Figura 19. Comportamento dos valores da frequência cardíaca e da parasitemia na anaplasmoze no período de patência e de convalescença, em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados. Belo Horizonte, 2010.



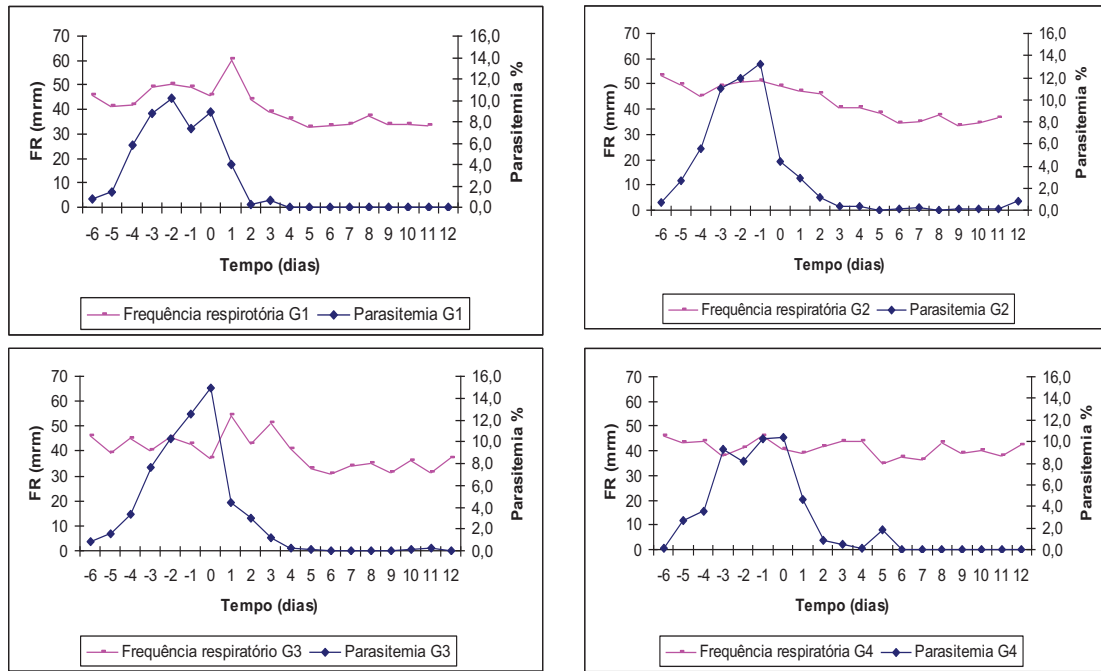


Figura 20. Comportamento dos valores da frequência respiratória e da parasitemia na anaplasmosse no período de patência e de convalescença, em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$  cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados. Belo Horizonte, 2010.

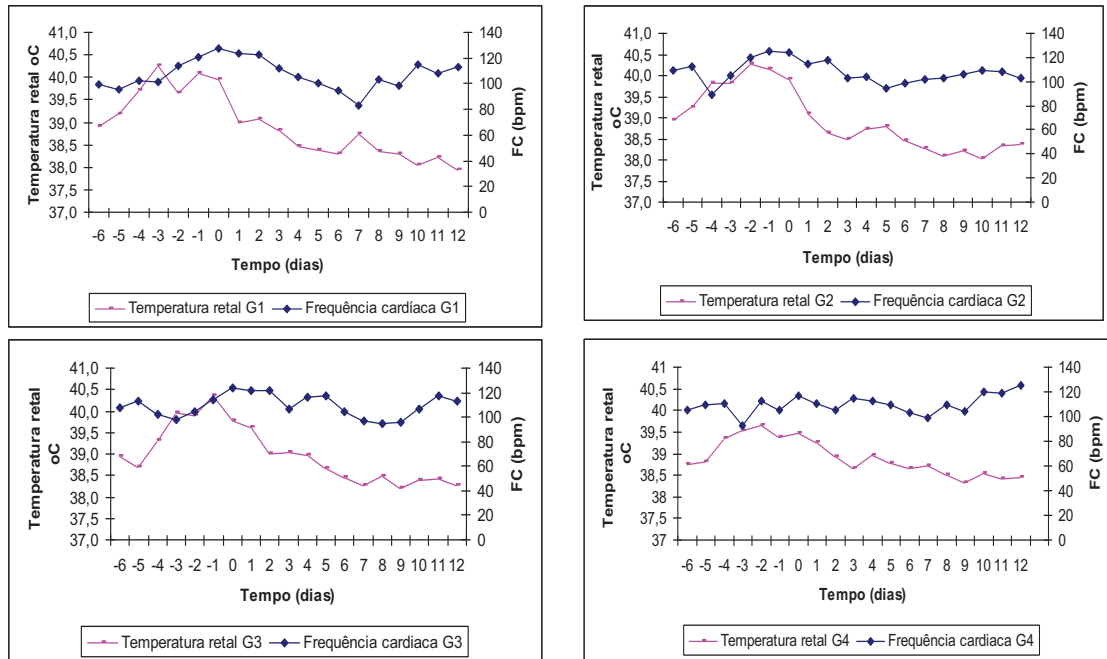


Figura 21. Comportamento dos valores da temperatura retal e da frequência cardíaca na anaplasnose no período de patência e de convalescença, em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados. Belo Horizonte, 2010.

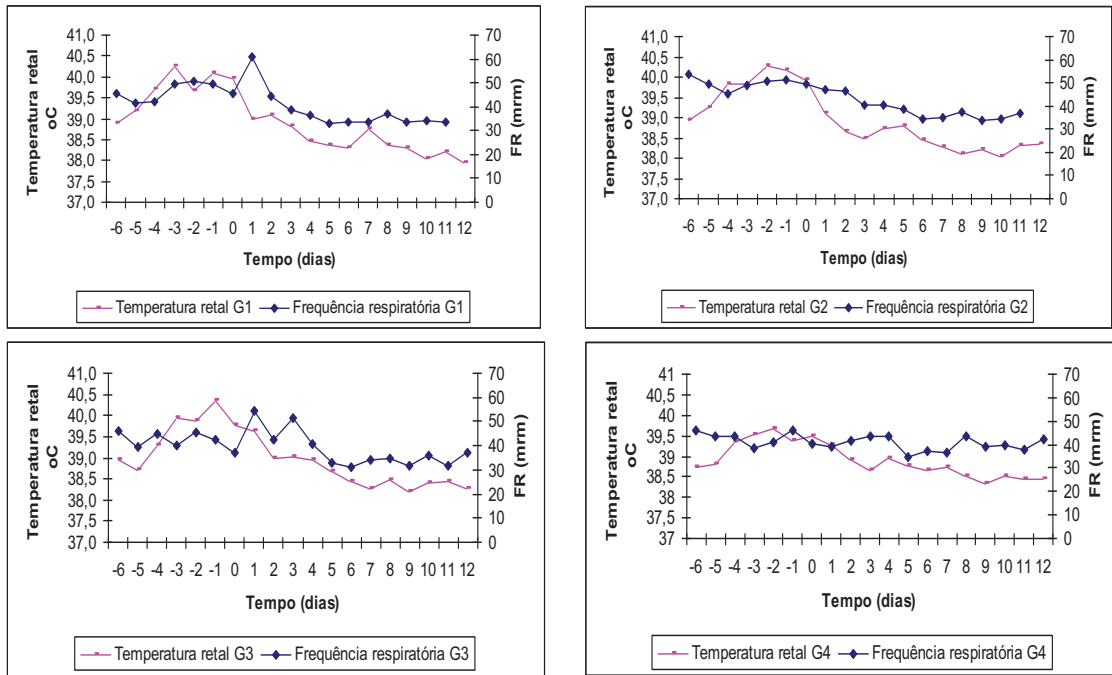


Figura 22. Comportamento dos valores da temperatura retal e da frequência respiratória na anaplasmose nos períodos de patência de convalescência, em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados. Belo Horizonte, 2010.

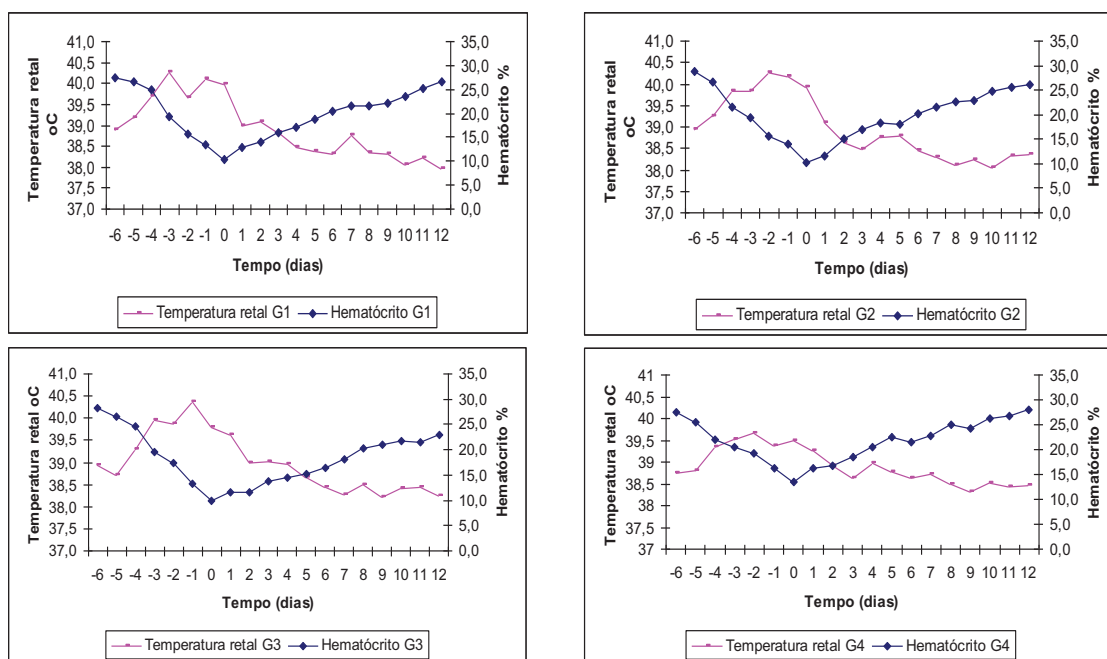


Figura 23. Comportamento dos valores da temperatura retal e do hematócrito na anaplasmose no período de patência e de convalescência, em bezerros HPB (n=20), com 6 meses de idade, vacinados (Grupo 1: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + adjuvante oleoso; Grupo 2: vacina contendo  $3 \times 10^9$  corpúsculos de *Anaplasma marginale* + sobrenadante da cultura + saponina (adjuvante); Grupo 3: vacina com sobrenadante da cultura + saponina; Grupo 4: solução salina + solução oleosa) e desafiados pela inoculação de corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ) cepa UFMG2 (considerada de alta patogenicidade). Dia 0 = dia em que os animais apresentaram menor valor de hematócrito e foram tratados. Belo Horizonte, 2010.

Tabela 10. Correlação das variáveis (frequência cardíaca, frequência respiratória, hematócrito, esfregaço de sangue e citometria de fluxo) de bezerros desafiados experimentalmente com corpúsculos de *Anaplasma marginale* ( $3 \times 10^5$ ), cepa UFMG2, do dia 27 ao 38 pós inoculação.

Dias*	FR						TR						Hematócrito (Ht)						Esfregaço (Esf)						Citometria					
	27	29	31	34	36	38	27	29	31	34	36	38	27	29	31	34	36	38	27	29	31	34	36	38	27	29	31	34	36	38
FC	-					0,55	-					0,53	0,54	-																
FR	-						-						0,8	-																
TR																														
Ht																														
Esf																														

\* As correlações foram realizadas considerando o dia da inoculação do desafio como o dia zero (0).