

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Anaplasma marginale DE ORIGEM CONGÊNITA E AVALIAÇÃO
DA VIRULÊNCIA EM BEZERROS EXPERIMENTALMENTE
INFECTADOS**

RODRIGO MELO MENESES

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2013**

RODRIGO MELO MENESES

Isolamento e caracterização molecular de *Anaplasma marginale* de origem congênita e avaliação da virulência em bezerros experimentalmente infectados

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da UFMG como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

Co-orientador: Antônio Último de Carvalho

Co-orientadora: Lygia Maria Friche Passos

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2013**

M543i Meneses, Rodrigo Melo, 1986-
Isolamento e caracterização molecular de *Anaplasma marginale* de origem congênita e avaliação da virulência em bezerros experimentalmente infectados / Rodrigo Melo Meneses. – 2013.
48 p. : il.

Orientador: Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

Co-orientadores: Antônio Último de Carvalho, Lygia Maria Friche Passos

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

1. Bezerro – Doenças – Teses. 2. Anaplasmoses – Teses. 3. Vacínias – Teses. I. Ribeiro, Múcio Flávio Barbosa. II. Carvalho, Antônio Último de. III. Passos, Lygia Maria Friche. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.208 969 6

Dissertação defendida e aprovada em 25 de janeiro de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro
Presidente



Dr. Gustavo Fontes Paz



Prof. Elias Jorge Facury Filho



Dra. Júlia Angelica Gonçalves da Silveira

*Aos meus pais, à minha irmã e à minha avó,
Pessoas fundamentais na minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as coisas boas que tem me proporcionado junto à minha família e aos meus amigos e por estar sempre ao meu lado nas horas difíceis.

Aos meus pais, Sérgio e Jussara, pelo amor, carinho, dedicação e luta incessante para que eu chegasse até aqui; e à minha irmã, Luciana, pela amizade.

Ao meu avô, José Alves (*in memoriam*), pelo grande incentivo para que eu participasse dessa caminhada, à minha avó (mãe), Maria Severiana, pelo amor, carinho e predileção, e à minha bisavó, pelo exemplo de vida.

Aos meus tios e primos, pelo apoio.

Aos professores Elias Facury, Antônio Último, Múcio Ribeiro, Lívio Molina, Valentin Gheller, Fabíola Paes Leme, Paulo Paes e Sandra Gesteira, pelos ensinamentos, em especial, ao prof. Múcio, pela orientação, paciência, disponibilidade, seriedade e contribuição para este trabalho, e aos prof. Último e Elias (Lobão), pela amizade, dedicação e exemplo profissional.

A todos os amigos adquiridos durante este período, sobretudo os que fazem parte da Família Ruminantes, em especial, Marina Ferreira, Moisés Freitas, José Zambrano, Hélio Martins, Tiago Facury, Gustavo Moreira, Júlia Gomes, Fernando Passon, Emerson Alvarenga, Daniele Miranda, Luciele Ferreira, Leandro Caxito, Ronaldo Martins e Helena Mendes pela colaboração mútua e companhia constante durante as horas de trabalho e lazer.

Às amigas do Laboratório de Protozoologia Veterinária, Bruna Silvestre e Júlia Silveira, pela colaboração com as análises moleculares deste trabalho, deixando de lado, muitas vezes, os seus afazeres para ajudar e à Paula Valente, pela sua solicitude.

À amiga Juliana Lima, pela realização das análises estatísticas.

Aos velhos amigos, pela compreensão da ausência em diversos momentos e principalmente a Arthur Prandi, pela grande ajuda durante a sua hospedagem.

Aos estagiários, que contribuíram fortemente para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente, Diogo, Danila, Raisal, Camila, Thaís, Hilton, Roberta, Marina, Naiara, Pedro Hugo, Nicole, Andrea, Rafael, Matheus, Débora, Lidiany e Mayara.

Ao médico veterinário da Fazenda São João, Paulo Henrique Garcia, por ter aberto a porteira da fazenda e disponibilizado os animais, assim como aos demais funcionários, pelos cuidados iniciais dos bezerros.

Aos funcionários da Escola de Veterinária, especialmente aos motoristas, pela colaboração no transporte dos animais e às secretarias da pós-graduação, pela disponibilidade e disposição em ajudar.

À equipe da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, sobretudo ao professor Helton Saturnino e Lúcio Gonçalves, e aos funcionários Renato e Airton pelos diversos auxílios referentes à alimentação dos animais.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e ao CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

Por fim, aos bezerros, protagonistas deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

Sumário

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Aspectos gerais da anaplasnose bovina.....	15
2.2. Transmissão vertical de <i>Anaplasma marginale</i>.....	18
2.3. Síndromes e parâmetros clínicos da anaplasnose bovina.....	18
2.4. Proteínas antigênicas e resposta imune contra <i>Anaplasma marginale</i>..	19
2.5. Diagnóstico molecular de anaplasnose bovina.....	21
2.6. Vacinas contra <i>Anaplasma marginale</i>.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Fase experimental I.....	24
3.1.1. Animais experimentais.....	24
3.1.2. Isolamento do <i>Anaplasma marginale</i>	25
3.1.3. Sequenciamento genético e caracterização dos isolados.....	26
3.2. Fase experimental II.....	27
3.2.1. Animais experimentais.....	27
3.2.2. Inoculação do isolado nos animais experimentais.....	27
3.2.3. Acompanhamento dos animais experimentais.....	27
3.2.4. Dados meteorológicos.....	28
3.3. Análises estatísticas.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29

4.1. Identificação de animais positivos e caracterização das cepas de <i>Anaplasma marginale</i>	29
4.2. Inoculação de bezerros com amostra de <i>Anaplasma marginale</i> de transmissão vertical	31
4.2.1. Período de incubação, de patência e convalescente.....	31
4.2.2. Riquetsemia e volume globular.....	32
4.2.3. Parâmetros clínicos.....	35
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência de animais positivos para <i>Anaplasma marginale</i> por diferentes testes em diversas regiões do Brasil.....	17
Tabela 2 - Sequência de iniciadores e produtos de cada reação para identificação de <i>A. marginale</i>	26
Tabela 3 - Programas utilizados para realização de <i>nested</i> PCR e PCR convencional para identificação de <i>A. marginale</i>	26
Tabela 4 - Condição para nPCR e PCR convencional com alvo nos genes <i>mSP4</i> e <i>mSP1a</i> , respectivamente, utilizando os <i>primers</i> MSP45/3 e MSP1aNF/R.....	26
Tabela 5 - Componentes e classificação do escore clínico e peso adotado para cada componente.....	28
Tabela 6 - Interpretação do grau de comprometimento referente ao escore clínico.....	28
Tabela 7 - Comparação das sequências de repetições de MSP1a entre os bezerros positivos (11,24 e 30) para <i>A. marginale</i>	29
Tabela 8 - Medianas de riquetsemia e volume globular (VG) de bezerros inoculados experimentalmente com o isolado UFMG3 de <i>Anaplasma marginale</i>	34
Tabela 9 - Medianas temperatura retal (TR), frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), movimentos ruminais (MR) e escore clínico de bezerros inoculados experimentalmente com o isolado UFMG3 de <i>Anaplasma marginale</i>	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema do ciclo de desenvolvimento de <i>A. marginale</i> em bovinos e carrapatos.....	15
Figura 2 -	Organograma da metodologia de identificação e isolamento de <i>A. marginale</i> de origem congênita em bezerros recém nascidos.....	24
Figura 3 -	Animais utilizados no experimento alojados em sistema <i>tie stall</i>	27
Figura 4 -	Identificação de animal positivo em gel de agarose 1% após eletroforese com produto da <i>nested</i> PCR com alvo no <i>msp4</i>	29
Figura 5 -	Dinâmica das medianas de VG e riquetsemia de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de <i>Anaplasma marginale</i>	32
Figura 6 -	Dinâmica das medianas de temperatura retal e riquetsemia de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de <i>Anaplasma marginale</i>	35
Figura 7 -	Dinâmica das medianas de frequência cardíaca e volume globular de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de <i>Anaplasma marginale</i>	36
Figura 8 -	Dinâmica das medianas de frequência respiratória e volume globular de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de <i>Anaplasma marginale</i>	36
Figura 9 -	Dinâmica das medianas dos movimentos ruminais e temperatura retal de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de <i>Anaplasma marginale</i>	37
Figura 10 -	Dinâmica das medianas do escore clínico, volume globular e riquetsemia de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de <i>Anaplasma marginale</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bpm	Batimentos cardíacos por minuto
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
CAT	Teste de aglutinação do cartão
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CF	Fixação de complemento
DCCV	Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunabsorventes ligados a enzimas
EV	Escola de Veterinária
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
HPB	Holandês Preto e Branco
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
LPS	Lipopolissacarídeo
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mov./5min.	Movimentos ruminais a cada cinco minutos
mpm	Movimentos respiratórios por minuto
MSP	Proteína principal de superfície
PB	Proteína bruta
PBS	Solução de tampão fosfato
PC	Período convalescente
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PI	Período de incubação
PP	Período de patência
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
TR	Temperatura retal
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

Diferenças na virulência entre isolados de *Anaplasma marginale* em bezerros com infecção vertical tem sido observadas. Dessa forma, objetivou-se identificar a infecção vertical de *A. marginale* em bezerros neonatos, caracterizar molecularmente as amostras e testar a virulência de um dos isolados. Coletou-se sangue de 30 bezerros HPB, recém-nascidos, para identificação de *A. marginale* pela técnica de PCR. Os animais positivos tiveram as amostras sequenciadas e caracterizadas. Oito bezerros livres de infecção por hemoparasitos foram inoculados com um dos isolados (UFMG3) e avaliou-se riquetsemia, volume globular (VG) e parâmetros clínicos. Entre os 30 bezerros acompanhados, três (10%) apresentaram-se positivos para *A. marginale*, com três diferentes sequências de nucleotídeos de alta similaridade (97-99%) com cepas depositadas no *Genbank*. A UFMG3 foi altamente semelhante ao isolado I19 de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). Os períodos de incubação, patência e convalescença da amostra foram de 20, nove e 31 dias, respectivamente. A riquetsemia atingiu valores máximos de 3,78 e 5,1%. O menor VG foi 13,5% um dia após o pico da riquetsemia. Hipertermia, taquicardia, taquipnéia e redução dos movimentos ruminais foram observados juntos ao pico da anemia assim como as demais alterações clínicas foram mais evidentes ao redor desse período. Concluiu-se, portanto, que a transmissão vertical de *A. marginale* ocorre com relativa frequência e diferentes isolados são capazes de serem transmitidos verticalmente em bovinos, além disso, que a UFMG3 possui baixa virulência, podendo ser utilizada como vacina viva.

Palavras-Chave: Anaplasmoses; vacina; riquetsemia; anemia.

ABSTRACT

Difference in virulence among isolates of Anaplasma marginale in calves with vertical infection has been observed. Thus, this study aimed to identify the vertical infection of A. marginale in newborn calves, molecularly characterize the samples and testing the virulence of one of the isolates. Blood samples were collected of 30 newborn Holstein calves to identification of A. marginale by PCR. The positive animals had samples sequenced and characterized. Eight calves free of hemoparasitic infection were inoculated with one of the isolates (UFMG3) and rickettsemia, packed cell volume (PCV) and clinical parameters were evaluated. Among the 30 calves accompanied, three (10%) were positive for A. marginale, with three different nucleotide sequences of high similarity (97-99%) with strains deposited in Genbank. UFMG3 was highly similar to the isolate I19-brown brocket deer (Mazama gouazoubira). Incubation, patent and convalescent periods were 20, nine and 31 days, respectively. The rickettsemia reached maximum values of 3.78 and 5.1%. The lowest value of PCV was 13.5% one day after the rickettsemia peak. Hyperpyrexia, tachycardia, tachypnea and reduced ruminal movements were seen together at the anemia peak as well as other clinical abnormalities were evident around this period. It is concluded, therefore, that vertical transmission of A. marginale occurs frequently and different isolates are capable of being vertically transmitted in cattle, in addition, UFMG3 has low virulence, could be used as a live vaccine.

Keywords: Anaplasmosis; vaccine; rickettsia; anemia.

1. INTRODUÇÃO

A anaplasmosse bovina constitui um dos principais entraves para a produção de bovinos em vários países (Barros et al., 2005; Kocan et al., 2010; Aubry e Geale, 2011). A doença é causada pela riquetsia *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) e se caracteriza pelo desenvolvimento de anemia, icterícia, febre, desidratação, perda de peso, aborto e mortes (Souza et al., 2001; Kocan et al., 2003; Marana et al., 2009). Na América Latina as perdas econômicas anuais causadas pela doença são estimadas entre US\$ 800 e 875 milhões (Kocan et al., 2003). No Brasil, é uma das principais causas de mortalidade de bezerros (Ribeiro et al., 1983) e os prejuízos determinados por *A. marginale*, juntamente à *Babesia bovis* e *B. bigemina*, são da ordem de US\$ 500 milhões ano⁻¹ (Grisi et al., 2002).

Na América do Sul, *A. marginale* é transmitido biologicamente pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, mecanicamente por moscas hematófagas (Guglielmone, 1995) e fômites contaminados (Kocan et al., 2003) e a transmissão vertical também tem sido descrita (Passos e Lima, 1984; Ribeiro et al., 1995; Benesi et al., 1999; Gonçalves et al., 2005). No Brasil, em geral, as condições climáticas são favoráveis para o desenvolvimento dos ciclos biológicos destes vetores durante todo o ano, favorecendo a sua transmissão, e consequentemente, estabelecendo uma área endêmica para anaplasmosse. Nestas regiões os bezerros são expostos ao agente nos primeiros meses de vida, quando ainda estão sobre proteção da imunidade passiva e de outros fatores responsáveis pela resistência natural contra a riquetsia (Vidotto e Marana, 2001). Esta situação cria uma condição epidemiológica denominada de estabilidade enzoótica, sendo raras as ocorrências de surtos e de mortalidade de animais adultos (Guglielmone et al., 1995; Souza et al., 2000), e é observada na maioria das regiões do país, as quais apresentam alta prevalência de animais sorologicamente positivos (Ribeiro et al., 1981; Souza et al., 2001; Andrade et al., 2001; Barros et al., 2005; Brito et al., 2010). Os animais geralmente apresentam alta morbidade com infecções subclínicas, baixa riquetsemia e redução do

volume globular, sendo comumente observados bezerros anêmicos e sujeitos a infecções intercorrentes (Guglielmone, 1995).

Porém, em algumas regiões do país não há transmissão do *A. marginale* durante todo o ano, quer por motivos climáticos, que desfavorecem o desenvolvimento do vetor, ou por utilizar sistema de criação nos quais os bezerros tem pouco ou nenhum contato com os carrapatos e moscas hematófagas. Esta situação estabelece a condição epidemiológica denominada de instabilidade enzoótica, caracterizada pela ocorrência de surtos e de casos clínicos de anaplasmosse em animais adultos, com alta mortalidade (Guglielmone, 1995). Este fato tem sido observado em diversas regiões, como no Sertão de Sergipe (Oliveira et al., 1992), e no Centro-Sul do Paraná (Marana et al., 2009).

As medidas de controle da anaplasmosse bovina em áreas endêmicas não visam impedir a infecção e, sim, reduzir a ocorrência de casos clínicos e a mortalidade de animais decorrentes da intensa riquetsemia e anemia provocada pelo *A. marginale* (Ribeiro e Lima, 1996). Dentre as medidas existentes para o controle da doença, a vacinação, utilizando vacinas vivas de amostras atenuadas, é considerada a alternativa mais efetiva e econômica (Kocan et al., 2003 e 2010; Aubry e Geale, 2011). A utilização de amostras de *A. centrale* em protocolos vacinais, embora utilizado com sucesso em vários países, tem trazido resultados insatisfatórios em várias ocasiões, levando ao descrédito pelos criadores. Amostras de *A. marginale* de baixa virulência tem sido isoladas (Ribeiro et al., 1997) e os resultados na imunização de bezerros são interessantes (Bastos et al., 2010).

Relatos de infecções persistentes por *A. marginale* em bezerros com infecção vertical tem sido descrito na literatura (Swift e Paumer, 1976; Zaugg e Kuttler, 1984; Zaugg, 1985; Potgieter e Van Rensburg, 1987; Salabarría e Pino, 1988, Ribeiro et al., 1995; Grau, 2006), sugerindo a baixa virulência dessas amostras. No entanto, casos clínicos da doença em bezerros neonatos também tem sido relatado (Bird, 1973; Paine e Miller, 1977; Norton et al., 1983; Passos e Lima, 1984; Benesi et al., 1999; Gonçalves et al., 2005; Pypers et al., 2011), demonstrando diferenças de virulência entre os

isolados (Zaugg e Kuttler, 1884, Zaugg, 1985; Potgieter e Van Rensburg, 1987). No Brasil não há notificação de isolados de *A. marginale* procedente de infecção vertical e nem a caracterização molecular destas amostras.

Objetivou-se, portanto, verificar a ocorrência de anaplasmosose congênita em neonatos bovinos, realizar a caracterização molecular dessas amostras e testar a sua virulência em bezerros hígdios.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da anaplasmosose bovina

A anaplasmosose pertence ao complexo Tristeza Parasitária Bovina (TPB) (Sacco et al., 2001). É uma doença hemolítica causada pela riquetsia *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910), reconhecida em exames de esfregaços sanguíneos como corpúsculos de inclusão localizados na periferia das hemácias. Em outra espécie de *Anaplasma*, denominada de *A. centrale*, os corpúsculos são observados no centro dessas células e esta espécie é relatada como menos virulenta (Kocan et al., 2003). As hemácias são consideradas os únicos locais de infecção de *A. marginale* em bovinos (Kocan et al., 2010), embora tem-se observado que as células endoteliais são prováveis locais de multiplicação desta riquetsia *in vitro* (Munderloh et al., 2004) ou *in vivo* (Carreño et al., 2007; Wamsley et al., 2011).

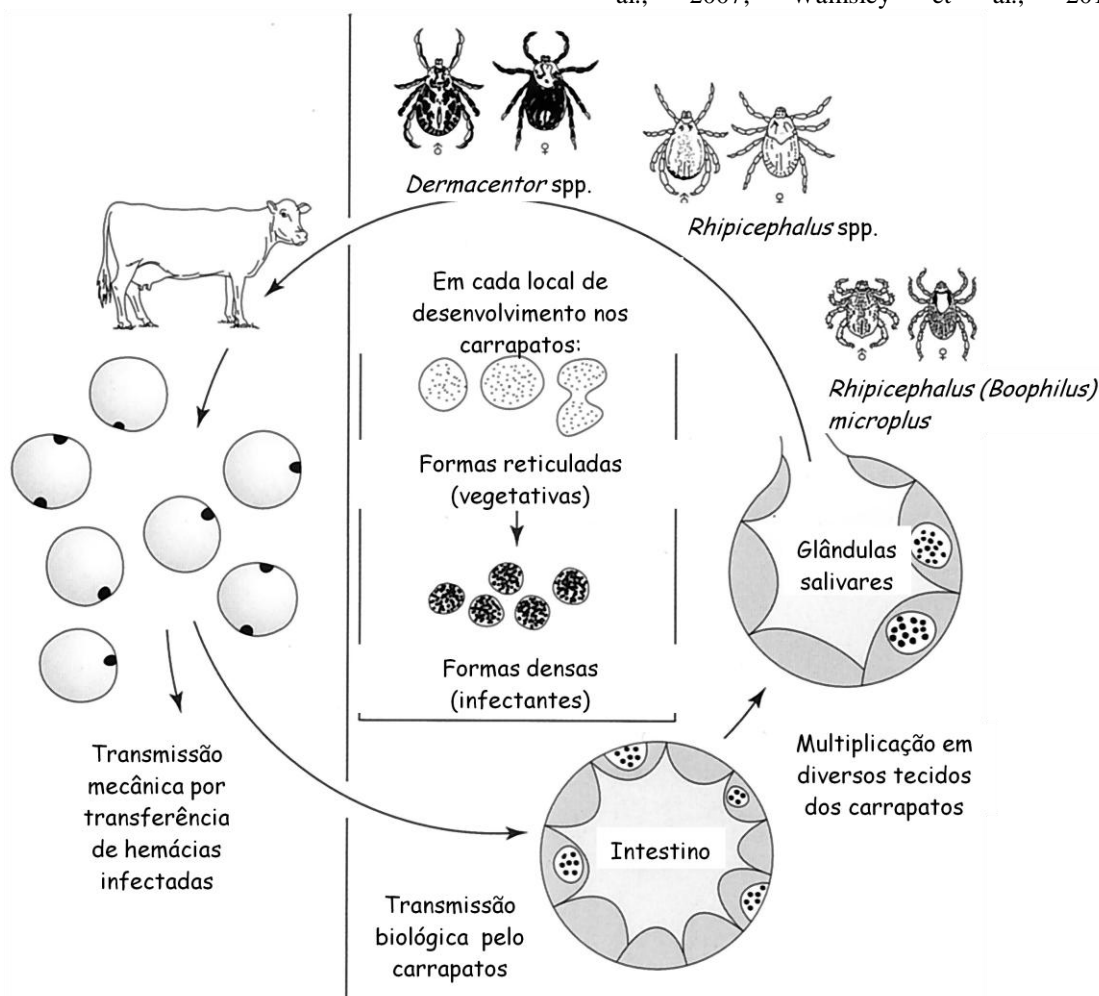


Figura 1. Esquema do ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* em bovinos e carrapatos. (Adaptado de Kocan et al., 2003)

As hemácias infectadas são ingeridas durante a alimentação do carrapato, sendo a fonte de infecção para as células intestinais do vetor (Figura 1). Após o desenvolvimento do *A. marginale* nas células do intestino do carrapato, vários tecidos se tornam infectados, inclusive as glândulas salivares, de onde a riquetsia é transmitida para os hospedeiros durante a alimentação do artrópode. *Anaplasma marginale* se desenvolve, em cada sítio de infecção dos carrapatos, em vacúolos ligados à membrana. A primeira forma é a reticulada (vegetativa), que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que podem conter centenas de organismos. Em seguida, há mudança para a forma densa, que é a forma infectante, e pode sobreviver fora das células do hospedeiro (Kocan et al., 2003).

O desenvolvimento de sinais clínicos da doença é mais comumente descrito em bovinos, mas outros ruminantes podem se tornar persistentemente infectados (Kocan et al., 2003; Brown, 2012). Os bovinos que sobrevivem à infecção aguda desenvolvem infecções persistentes caracterizadas por riquetsemias baixas e cíclicas a cada 10-14 dias (Kocan et al., 2003) ou até cinco semanas (Kieser et al., 1990). Estes animais servem como reservatórios do agente, sendo fonte de sangue infectado para transmissão mecânica e biológica (Andrade et al., 2001; Kocan et al., 2003; Ribeiro et al., 2003; Brito et al., 2010).

A transmissão de *A. marginale* pode ser efetuada, principalmente, da forma mecânica através de moscas hematófagas ou fômites contaminados (agulhas, brincos, argolas nasais, instrumentos de tatuagem, descorna e castração) e biologicamente por carrapatos (Kessler, 2001; Kocan et al., 2003; Aubry e Geale, 2011). A transmissão mecânica por artrópodes tem sido relatada por *Tabanus*, *Stomoxys* e mosquitos (Kessler, 2001), constituindo a principal via de disseminação de *A. marginale* em áreas da América Central e do Sul e da África. O carrapato presente nestas áreas é o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, que por ser um hospedeiro monoxênico e a transmissão transovariana parecer ser esporádica (Ribeiro et al., 1996; Kessler, 2001), tem sua importância atribuída principalmente à transmissão intraestadial através dos machos (Guglielmone,

1995; Kocan et al., 2003) devido à mobilidade destes, aliado ao hábito gregário dos bovinos, facilitando a passagem de um animal para outro (Kessler, 2001).

O período de incubação (PI) da anaplasose bovina é de sete a 60 dias (média de 28 dias), dependendo do número de organismos presentes na dose infectante (Kocan et al., 2003) e da virulência do isolado (Andrade et al., 2001). Durante o período patente (PP) a riquetsemia aumenta geometricamente (Rodríguez et al., 2000), sendo comum observar animais com 15 a 75% de riquetsemia (Kocan et al., 2003; Meléndez, 2005).

A anaplasose bovina é uma doença que possui ampla distribuição geográfica, particularmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo considerada endêmica em vários países da América Central e do Sul, além do Caribe, com exceção nas áreas de deserto e elevadas altitudes (Guglielmone, 1995; Kocan et al., 2003). A soroprevalência em países das Américas é variável, contribuindo para a formação de áreas enzoóticas estáveis e instáveis (Kocan et al., 2003). No Brasil (Tabela 1), Ribeiro e Reis (1981) verificaram a prevalência em quatro regiões de Minas Gerais, sendo de 86,5% no Alto Paranaíba, 83,7% na Zona Metalúrgica, 91,6% no Sul de Minas e 86,4% no Triângulo Mineiro. No Sertão de Sergipe, Oliveira et al. (1992) relataram 12,3% dos animais positivos no esfregaço sanguíneo para *A. marginale*. No Estado do Rio de Janeiro, Souza et al. (2000) observaram a prevalência de 91,16% no Norte Fluminense e Souza et al. (2001) relataram que 98,21% dos bovinos apresentavam anticorpos contra *A. marginale* no Médio Paraíba. Na Bahia, em municípios da região semiárida, Barros et al. (2005) verificaram que 94,8-97% dos animais eram sorologicamente positivos. Já no Paraná, Andrade et al. (2001) observaram que 92,94% dos animais eram soropositivos na região de Londrina, enquanto Yoshihara et al. (2003) e Marana et al. (2009) relataram 76,1% e 58,74% dos animais reagentes à *A. marginale* no Noroeste e Centro-Sul do estado, respectivamente. No Sudoeste da Amazônia, Brito et al. (2010) observaram uma frequência de infecção de 98,6% nos animais de Rondônia e 92,87% do Acre.

Tabela 1. Prevalência de animais positivos para *Anaplasma marginale* por diferentes testes e em diversas regiões do Brasil

ESTADO	REGIÃO	PREVALÊNCIA	TESTE	REFERÊNCIA
Minas Gerais	Alto Paranaíba	86,5%	CAT	Ribeiro e Reis, 1981
	Zona Metalúrgica	83,7%		
	Sul de Minas	91,6%		
	Triângulo Mineiro	86,4%		
Sergipe	Árida a subúmida	16,3%	CAT	Oliveira et al., 1992
		12,3%	Esfregação	
Rio de Janeiro	Norte Fluminense	91,16%	ELISA indireto	Souza et al., 2000
	Médio Paraíba	98,21%		Souza et al., 2001
Paraná	Londrina	92,94%	ELISA competitivo	Andrade et al., 2001
	Noroeste	76,1%		Yoshihara et al., 2003
	Centro-Sul	58,54%		Marana et al., 2009
Bahia	Semiárida	94,8-97%	ELISA indireto	Barros et al., 2005
Rondônia	Amazônia	98,6%	PCR	Brito et al., 2010
Acre		92,87%		

Em regiões onde o inverno é mais rigoroso, ou o verão atinge temperaturas elevadas, há redução significativa da população de vetores (moscas e mosquitos hematófagos e carrapatos). Com isso, os animais nascidos no período da seca são desafiados com baixa população de vetores e aproximadamente 70% deles adquirem a infecção por *A. marginale* somente nos meses de outubro ou novembro (estação chuvosa), independentemente da idade (Melo et al., 2001). Nessa época, devido à redução natural da imunidade passiva, ao se infectarem os animais de cinco a sete meses de idade estão sujeitos a desenvolver doença clínica (Ribeiro et al., 2003).

O diagnóstico direto da anaplasmosse bovina pode ser feito através da detecção de corpúsculos intraeritrocitários marginais de *A. marginale* em esfregaços sanguíneos com coloração de Giemsa (Vidotto e Marana, 2001; Aubry e Geale, 2011) ou corados pelo método de Romanowsky de animais com a forma clínica da doença. No entanto, este método somente consegue detectar níveis acima de 10^6 hemácias infectadas por mL de sangue (Gale et al., 1996a), apresentando reduzida sensibilidade na detecção em animais com baixa ricketsemia.

Animais portadores são diagnosticados através de exames sorológicos como reação de imunofluorescência indireta (RIFI), fixação de complemento (CF), teste de aglutinação do cartão (CAT) e ensaios imunoabsorventes ligados a enzimas (ELISA); ou através de citometria de fluxo; ou por meio de métodos moleculares como a PCR (reação em cadeia da polimerase) (Aubry e Geale, 2011; OIE, 2012).

Porém, no campo, o diagnóstico de anaplasmosse, na maioria das vezes, é realizado com base nos sinais clínicos que, geralmente, só aparecem alguns dias após o pico da ricketsemia, quando a anemia já é intensa (Coelho, 2007).

As medidas de controle da anaplasmosse consistem praticamente as mesmas utilizadas nos últimos 60 anos (Kocan et al., 2010). De acordo com Souza et al. (2001) e Coelho (2007), para se estabelecer um programa de controle, faz-se necessário o conhecimento epidemiológico dessa enfermidade. As medidas variam com a região geográfica e, em regiões endêmicas, incluem o controle de artrópodes com acaricida e higienização adequada das instalações; a prevenção de transmissão horizontal por fômites; quimioprofilaxia; e imunização (Vidotto e Marana, 2001; Kocan et al., 2010; Aubry e Geale, 2011). O controle de carrapatos é complexo, podendo ser aplicado apenas em algumas áreas e prevenindo parcialmente a infecção, já que há outras formas de transmissão. Nas áreas de instabilidade enzoótica, a administração de antimicrobianos ou inoculação de bezerros com vacina viva tem sido utilizada (Ribeiro et al., 2003). Contudo, a quimioterapia é uma prática de alto custo, e de aplicação limitada em criações extensivas (Kocan et al., 2003 e 2010). Deve-se ressaltar que estas medidas não visam impedir a infecção e, sim, reduzir a ocorrência de casos clínicos e a mortalidade de animais decorrentes da intensa ricketsemia e consequente redução do volume globular (Ribeiro e Lima, 1996).

Os tratamentos usualmente realizados se baseiam no combate ao agente etiológico, não considerando as alterações decorrentes da anemia (Coelho, 2007), com a utilização de quimioterápicos como as tetraciclinas, imidocarb e enrofloxacina (Kocan et al., 2010; Aubry e Geale, 2011, Facury Filho et al., 2012). Invariavelmente, quando os animais são tratados dessa forma, o número de células infectadas é baixo e o tratamento com antimicrobianos não interfere na recuperação do volume globular (VG). Estes fatores contribuem para a baixa eficiência no tratamento convencional e para as altas taxas de mortalidade observadas na anaplasmoze bovina (Coelho, 2007). Dessa forma, a inclusão da hidratação e transfusão sanguínea podem ser necessárias para evitar a morte do animal (Facury Filho et al., 2012).

2.2. Transmissão vertical de *Anaplasma marginale*

A anaplasmoze clínica tem sido relatada em bezerros neonatos (Bird, 1973; Paine e Miller, 1977; Norton et al., 1983; Passos e Lima, 1984; Benesi et al., 1999; Gonçalves et al., 2005; Pypers et al., 2011). Adicionalmente, infecções persistentes em bezerros recém-nascidos foram descritas (Swift e Paumer, 1976; Zaugg e Kuttler, 1984; Zaugg, 1985; Potgieter e Van Rensburg, 1987; Salabarría e Pino, 1988; Ribeiro et al., 1995; Grau, 2006). Nestes casos, a transmissão vertical de *A. marginale* tem sido demonstrada através de inoculação de sangue de fetos e bezerros neonatos em animais esplenectomizados (Swift e Paumer, 1976; Zaugg e Kuttler, 1984; Zaugg, 1985) ou após esplenectomia dos mesmos (Potgieter e Van Rensburg, 1987).

A infecção vertical por *A. marginale* foi considerada de pouca importância epidemiológica devido à sua baixa frequência (Bird, 1973). No entanto, segundo Ribeiro et al. (1995) e Pypers et al. (2011), a importância desta via de transmissão não está esclarecida, podendo ter potencial na epidemiologia da doença em algumas regiões (Swift e Paumer, 1976; Salabarría e Pino, 1988; Benesi et al., 1999; Kocan et al., 2003; Aubry e Geale, 2011), e ocasionar perdas significativas se não diagnosticadas nos rebanhos (Norton et al., 1983).

Entre os casos de anaplasmoze clínica neonatal, Bird (1973), na África do Sul, e Northon et al. (1983), na Austrália, relataram a morte de dois bezerros nascidos de vacas com ausência de sinais clínicos durante a gestação. Ainda na África do Sul, Paine e Miller (1977) e Gonçalves et al. (2005), no estado de São Paulo, também relataram a morte de dois bezerros na primeira semana de vida, mesmo após o início do tratamento com oxitetraciclina. Em Minas Gerais, Passos e Lima (1984) identificaram, através de esfregaços sanguíneos corados por Giemsa, *A. marginale* em um bezerro de dois dias de idade, com riquetsemia de aproximadamente 15%, o qual morreu cinco dias após esplenectomia. No entanto, Zaugg e Kuttler (1984), nos Estados Unidos, descreveram um caso em que um bezerro recém-nascido se tornou doente após infecção experimental e se recuperou após tratamento. Recentemente, na África do Sul, Pypers et al. (2011) relataram um caso de anaplasmoze congênita, não responsiva ao tratamento, em um bezerro recém-nascido, que *post mortem*, verificou-se coinfeção com o vírus da diarréia viral bovina (BVDV), propondo que a imunossupressão resultante da infecção pelo BVDV predispôs à anaplasmoze aguda e fatal.

Estudos realizados para demonstrar a transmissão vertical, utilizando vacas portadoras, bem como animais infectados durante a gestação, com apresentação clínica da doença, evidenciaram ausência de sinais clínicos na progênie (Swift e Paumer, 1976; Zaugg e Kuttler, 1984; Zaugg, 1985; Potgieter e Van Rensburg, 1987). Em vacas com infecção aguda, especialmente no último terço de gestação, a ocorrência da transmissão vertical é alta, chegando a quase 90%, conforme observado por Salabarría e Pino (1988). No entanto, na África do Sul, Potgieter e Van Rensburg (1987) e Grau (2006), no Rio Grande do Sul, encontraram 12,5 e 10,5% de bezerros positivos no CAT e PCR, respectivamente, oriundos de vacas cronicamente infectadas, valores estes bastante superiores ao observado por Ribeiro et al. (1995) em fetos bovinos (2,1%).

2.3. Síndromes e parâmetros clínicos da anaplasmoze bovina

As síndromes clínicas da anaplasmoze podem ser divididas em superaguda, aguda e crônica (Vidotto e Marana, 2001). Os sinais clínicos consistem no desenvolvimento de anemia discreta a intensa, icterícia sem hemoglobinemia e hemoglobinúria, febre, perda de apetite e de peso, desidratação, aborto e letargia (Souza et al., 2001; Kocan et al., 2003). A rápida multiplicação do agente e consequente intensa hemocaterese torna a bile espessa, grumosa, de cor amarelada e os tecidos ictericos (Souza et al., 2000). O volume globular usualmente sofre queda de 30 a 50% (Brown, 2012), com anemia mais intensa após a passagem pelo estágio agudo da doença (Radostits et al., 2007).

As alterações clínicas de animais com anaplasmoze são discretas no início da doença e só se evidenciam quando a anemia é intensa. No entanto, a temperatura retal consiste num bom parâmetro a ser avaliado, indicando o momento ideal para o tratamento com antimicrobianos antes do agravamento da anemia (Coelho, 2007).

O aumento da temperatura ocorre lentamente e raramente é superior a 40,5°C. Em casos superagudos, com início súbito de febre alta, anemia, icterícia, dispneia intensa e morte, frequentemente dentro de 24 horas são comuns em bovinos adultos (Radostits et al., 2007). A febre não é característica exclusiva da enfermidade, mas é de grande importância para o diagnóstico. No diagnóstico clínico deve-se considerar um conjunto de sinais, incluindo taquipnéia e taquicardia, perda parcial de apetite, depressão, dentre outros, sendo a hipertermia, o sinal preponderante. A taquipnéia associada à febre ocorre para auxiliar a perda de calor pela respiração e ofertar maior volume de oxigênio às células e aos tecidos. O aumento da frequência cardíaca (FC) ocorre a uma taxa de 10 a 15 batimentos por minuto (bpm) para cada grau elevado. Microrganismos e antígenos podem produzir febre por mediar a liberação de citocinas, alterando o ponto fixo do centro termorregulador no hipotálamo (Feitosa, 2008).

Durante o curso da infecção por *A. marginale* não há associação direta entre a riquetsemia e intensidade da anemia, sugerindo a existência de outros fatores envolvidos no processo de fagocitose das hemácias (Giardina et al., 1993).

Há evidências que durante o ciclo biológico do *A. marginale* ocorre alterações estruturais e bioquímicas na membrana celular das hemácias infectadas. Estas hemácias alteradas pela infecção por *A. marginale* induzem uma reposta imune humoral cujos anticorpos aderem às células infectadas e não infectadas. Estas células ao passar pelo sistema monocítico fagocitário são retiradas da circulação, a uma taxa de 8 a 10 vezes superior à normal (Rodríguez et al, 2000), provocando anemia. Durante a fase aguda da anaplasmoze, os menores valores de volume globular ocorre 1-6 dias após o pico de riquetsemia (Giardina et al., 1993), reforçando o envolvimento dos anticorpos na patogenia da anemia.

As manifestações clínicas da anemia incluem mucosas hipocoradas, taquicardia e hiperfonese e apatia. Esses sinais podem ser agudos ou crônicos e de intensidade variável. As trocas gasosas e o transporte de oxigênio são deficientes em animais com anemia, tornando-os hipercapnêicos. Alterações como fraqueza e letargia podem acompanhar as anemias intensas, os quais podem mimetizar problemas respiratórios, uma vez que o animal tem que respirar com maior rapidez e profundidade para compensar a falha na oxigenação sanguínea (Feitosa, 2008). Coelho (2007) observou acidose metabólica, com redução do pH sanguíneo, da pCO₂, da concentração de bicarbonato e do excesso de base e elevação da frequência respiratória em bezerros após inoculação experimental de *A. marginale* como consequência da redução do VG.

2.4. Proteínas antigênicas e resposta imune contra *Anaplasma marginale*

Mecanismos humorais e celulares encontram-se envolvidos na imunidade contra *Anaplasma*, os quais agem em conjunto para combater a infecção (Brown et al., 2001; Araújo et al., 2003; Grafias et al., 2003 e Kocan et al., 2003). Pelo fato de *A. marginale* não se multiplicar em células que expressam moléculas de MHC, a imunidade protetora à infecção necessita da ativação de células T CD4⁺ e anticorpos (Brown, 2012). O linfócito T CD4⁺ expressa interferon gama (INF-γ), 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 (Araújo et al., 2003; Grafias et al., 2003 e Kocan et al., 2003; Brown, 2012).

Pesquisas realizadas nas últimas décadas tem contribuído bastante para o conhecimento da composição antigênica de *A. marginale* e o papel das proteínas de superfície (*Major Surface Protein* – MSP) no desenvolvimento de imunidade protetora contra essa riquetsia. Seis proteínas de superfície de *A. marginale* foram identificadas: 1a, 1b, 2, 3, 4 e 5 (Kocan et al., 2003). No entanto, Dark et al. (2011) relataram que vários outros antígenos de superfície de *A. marginale*, denominados de superfamília *mSP2*, tem sido encontrados recentemente.

A MSP1a, MSP4 e MSP5 são codificadas por genes únicos, enquanto que as demais são codificadas por famílias multigênicas (Kocan et al., 2003). A MSP1a é uma adesina, tanto para hemácias bovinas, quanto para células de carrapato (de la Fuente et al., 2001; Kocan et al. 2003). Ela é variável no peso molecular entre os isolados geográficos devido aos diferentes números de repetições de aminoácidos em *tandem*. Por isso, o gene *mSP1a* tem sido usado como marcador genético estável para identificação de isolados geográficos de *A. marginale* (Kocan et al., 2003). Esse gene é conservado durante a multiplicação da riquetsia em bovinos e carrapatos (Bowie et al., 2002; Kocan et al., 2003).

A MSP1b, codificada por pelo menos dois genes, é polimórfica entre isolados geográficos de *A. marginale* e também é uma adesina, porém apenas para hemácias bovinas. Por ser codificada por grandes famílias multigênicas, a MSP2 varia a sua composição antigênica durante a riquetsemia em bovinos e em carrapatos persistentemente infectados. Isto também ocorre com a MSP3, que possui variações em propriedades antigênicas e estrutura entre os isolados geográficos. Ambas se encontram envolvidas na indução de uma resposta imune protetora para *A. marginale*. Por outro lado, a MSP4 e MSP5, por serem codificadas por genes únicos, são altamente conservadas, porém suas funções não são conhecidas, mas tem sido efetivas como antígeno diagnóstico (Kocan et al., 2003).

Brown et al. (1998) relataram que MSP purificadas podem induzir uma resposta por linfócitos T CD4⁺, prevenindo a riquetsemia. Além disso, correlação entre altos títulos de anticorpos contra as MSP e proteção contra a anaplasnose foi demonstrada. Porém, problemas ligados à variação antigênica e à ausência de proteção contra o desafio enfatizam a importância de células T CD4⁺ na resposta imune contra anaplasnose, sendo estas células as responsáveis pela ligação entre as respostas imunes inata e adquirida (Brown et al., 1998).

De acordo com Grafias et al. (2003), as MSP induzem a produção de imunoglobulinas, principalmente a IgM, durante a fase de início da riquetsemia, e em seguida, a IgG2, durante o período de patência da infecção. Riquetsemias cíclicas ocorrem devido à evasão que o *A. marginale* desencadeia frente ao sistema imune do hospedeiro através do surgimento e replicação de variantes antigênicas em cada ciclo, as quais não são reconhecidas pelos anticorpos até então presentes naquele momento e são posteriormente controladas com o desenvolvimento de IgG2 direcionada contra a região hipervariável específica de MSP2 e MSP3. Estes mecanismos de evasão incluem a perda de lipopolissacarídeo (LPS) e peptídeo glicano, responsáveis pela ativação da defesa imune inata e deleção e/ou anergia das respostas de células T específicas para MSP (Brown, 2012).

Bezerros são menos susceptíveis à infecção por *A. marginale*, e quando apresentam sinais clínicos da doença, são menos evidentes (Guglielmone, 1995; Palmer, 2002; Ribeiro et al., 2003). O mecanismo pelo qual animais jovens são menos susceptíveis à doença não é bem conhecido, mas, segundo Melo (1999), está associado à imunidade passiva, a uma melhor resposta imunológica por meio da imunidade celular decorrente da persistência do timo, da alta atividade eritropoiética da medula óssea e da possível ação protetora da hemoglobina fetal.

A remoção do baço torna os bezerros susceptíveis à infecção, com manifestações clínicas mais intensas (Kocan et al., 2003). Animais esplenectomizados não controlam a riquetsemia, enquanto animais com baço *in situ*, a infecção aguda geralmente é resolvida

(Brown, 2012). A esplenectomia prejudica a formação de IgM, a qual é responsável por 75% da atividade de fixação do complemento. Além disso, o baço tem importante função no desenvolvimento e manutenção da imunidade, uma vez que as hemácias infectadas são rapidamente removidas da circulação (Vidotto e Marana, 2001).

Ao recuperar da infecção, os animais se tornam portadores, com imunidade duradoura, caracterizada por altos títulos de anticorpos, responsividade de células T e baixa riquetsemia. Estes animais resistem ao desafio com amostras homólogas ou heterólogas de *A. marginale*, no entanto, são incapazes de eliminar a infecção (Palmer, 2002). Somente os anticorpos não protegem os bezerros da infecção, havendo necessidade da associação com a imunidade celular para o controle da anaplasiose (Gale et al., 1992).

Apesar de anticorpos apenas não serem suficientes para proteção contra *Anaplasma* (Brown et al., 2001), mas eles são necessários para fornecer especificidade para a fagocitose pelos macrófagos e para impedir a invasão de novas hemácias (Brown, 2012). Devido a isso, os níveis séricos de IgM bovina aumentam uma semana antes do pico de riquetsemia. Isótopos de IgM sérica participam mais eficientemente que IgG em funções como opsonização, ativação do complemento e aglutinação de microrganismos estranhos. As opsoninas, que medeiam e melhoram o processo de fagocitose durante a anaplasiose foram caracterizadas como moléculas IgM e IgG, e seus títulos máximos durante a infecção coincidem com a anemia mais intensa. Estas imunoglobulinas, juntamente com as frações do complemento, como o C3b, desempenham papel sinérgico durante a fagocitose (Meléndez, 2005).

2.5. Vacinas contra *Anaplasma marginale*

A vacinação é uma das medidas de controle da anaplasiose bovina, juntamente ao controle de artrópodes e a quimioprofilaxia. Dentre estas, é considerada o meio mais econômico e efetivo para o controle da doença. Existem dois tipos principais de vacinas, vivas e mortas (Kocan et al., 2003 e 2010). As duas formas são originadas de hemácias infectadas com *A.*

marginale como fonte de antígeno ou corpúsculos oriundos de cultura em células IDE8 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 (Kocan et al., 2003 e 2010; Bastos et al., 2009; Lasmar et al., 2012).

O desenvolvimento de uma vacina efetiva na prevenção da infecção por *A. marginale* é difícil devido ao grande número de amostras em uma determinada área geográfica (de la Fuente et al., 2002). Falhas vacinais ocorrem principalmente devido a variações da expressão de variantes das MSP2 e MSP3 (Dark et al., 2011). Portanto, a obtenção de proteção contra uma grande variedade de amostras é altamente desejável quando se desenvolve uma vacina contra anaplasiose (Aubry e Geale, 2011).

Vacinas vivas envolvem a infecção de bovinos via inoculação com hemácias infectadas com isolados menos virulentos de *A. marginale* ou de *A. centrale* (Benavides et al., 2000; Kocan et al., 2003 e 2010; Aubry e Geale, 2011). Além disso, corpúsculos de *A. marginale* oriundos de cultura em células IDE8 também podem ser utilizados (Bastos et al., 2009). Bovinos vacinados desenvolvem infecções persistentes, que induzem imunidade protetora de longa duração, não necessitando de revacinação. As diferentes estratégias utilizando organismos vivos incluem: infecção e tratamento (requer supervisão de um veterinário, que aumenta o custo; a dificuldade de monitoramento dos animais para efetivo tratamento a tempo a torna impraticável, especialmente em grandes rebanhos); vacinas vivas contendo cepas atenuadas de *A. marginale* (por passagem em ovinos ou veados e/ou por irradiação de cepas patogênicas) e vacinas vivas contendo o *A. centrale*, que é menos patogênico (Kocan et al., 2003).

De acordo com Kocan et al. (2010), a proteção de vacinas atenuadas é incerta. As reações clínicas variam de discreta a intensa dependendo do processo de modificação do organismo ou idade dos animais vacinados. A vantagem das vacinas vivas é que a imunidade contra o desafio é sólida e duradoura, mas o

risco de transmissão de outros patógenos ainda permanece (Rodríguez et al., 2000).

A utilização de *Anaplasma centrale* foi a primeira tentativa de uma vacina, que ocorreu no início dos anos 1900 (Dark et al., 2011). *A. centrale* é menos patogênico para bovinos e atualmente tem sido utilizado como vacina atenuada em Israel, Austrália, África e América do Sul. Há proteção cruzada entre *A. centrale* e *A. marginale* porque epitopos de células T CD4⁺ são conservados na resposta à infecção pelas duas espécies (Shkap et al., 2002a). Além disso, a variação antigênica da MSP2 na infecção persistente com *A. centrale* ocorre de maneira similar ao descrito para *A. marginale* (Shkap et al., 2002b). Block e de Vos (2001), na Austrália, utilizaram vacina viva de *A. centrale* e relataram uma resposta variável, porém com uma proteção ao desafio adequada na maioria dos casos. No entanto, o sucesso da vacina pode variar com outras cepas de *A. marginale* com as quais os animais serão expostos (Kocan et al., 2010; Aubry e Geale, 2011). Payne et al. (1990), no Paraguai, observaram que inóculos de *A. centrale* não conferiram proteção suficiente contra *A. marginale* após desafio a campo. No Brasil, Sacco et al. (2001), ao comparar animais desafiados naturalmente com *A. marginale* em grupos inoculados ou não (controle) com *A. centrale*, não chegaram a conclusões sobre a real proteção do inóculo de *A. centrale* frente a desafio com *A. marginale*. Segundo Rodríguez et al. (2000), estas vacinas são melhor utilizadas em novilhas, pois podem induzir moderados sinais agudos em bovinos mais velhos.

Adicionalmente, a utilização de inóculo homólogo padronizado (inóculo de *A. marginale* com quantidade padronizada de hemácias infectadas) consiste em uma medida viável para o controle da anaplasmoze bovina (Ribeiro et al., 2003). Estes autores verificaram riquetsemia média de 1,2% e redução média de VG de 23% em animais pré-imunizados, enquanto animais tratados com oxitetraciclina apresentaram riquetsemia de 2,7% e redução de 36,3% no VG. Bastos et al. (2010) demonstraram resultados satisfatórios após utilizar vacina viva com um isolado de baixa virulência (UFMG1) e posteriormente desafiado com uma amostra de alta virulência

(UFMG2), apesar da redução de 63% no VG. Esses autores sugeriram a possibilidade da utilização da cepa UFMG1 para a vacinação contra isolados heterólogos. Benavides et al. (2000) testaram, na Colômbia, uma vacina contendo *A. marginale* de aparente baixa virulência e também observaram redução intensa do VG em alguns animais (valores inferiores a 15%), e ressaltaram a necessidade de monitoramento após a vacinação.

As vacinas mortas possuem algumas vantagens em relação às vacinas vivas, como o menor risco de transmissão de outros patógenos e o menor custo de estocagem. No entanto, tem-se a necessidade de *boosters* anuais, maior custo de purificação das hemácias infectadas, falta de proteção cruzada entre isolados de áreas geográficas distantes e usualmente apresenta imunidade protetora inferior à produzida por vacinas vivas (Kocan et al., 2003 e 2010). A primeira vacina morta comercializada foi desenvolvida através de amostras de *A. marginale* obtidas de hemácias hemolisadas (Brock et al., 1965). A presença de estroma de hemácias nessa vacina resultou no desenvolvimento de isoanticorpos eritrocitários em animais vacinados, os quais produziram colostro com altos títulos de anticorpos e, com isso, os bezerros nascidos desses animais, após mamar o colostro, desenvolveram anemia hemolítica (Dennis et al., 1970).

Recentemente, Kocan et al. (2010) sugeriram que vacinas desenvolvidas com tecnologia molecular podem representar um método de controle mais efetivo contra a anaplasmoze. Tentativas em produzir diversas vacinas de subunidade foram realizadas, porém nenhuma delas forneceu proteção completa contra o desafio heterólogo. Contudo, novos candidatos a antígenos vacinais para o desenvolvimento de vacinas recombinantes com vários componentes já tem sido pesquisados (Dark et al., 2011).

2.6. Diagnóstico molecular da anaplasmoze bovina

A PCR é uma técnica para amplificação *in vitro* de sequência específica de DNA, altamente sensível, desenvolvida para detectar pequenas quantidades de DNA de diferentes agentes em amostras de sangue ou tecidos. Esta técnica

amplifica repetidamente uma sequência específica de DNA do genoma do organismo alvo, produzindo um produto facilmente detectável (Vidotto e Marana, 2001). A sensibilidade analítica da PCR tem sido estimada a 0,0001% de hemácias infectadas (Vidotto e Marana, 2001; OIE, 2012). Devido à alta sensibilidade e especificidade da técnica de PCR (Brito et al., 2010), ela é, inclusive, utilizada para validar outras técnicas de diagnóstico e emissão de certificado para exportação de animais (Vidotto e Marana, 2001).

A modificação da técnica através da introdução de uma segunda reação de amplificação do DNA a partir do produto da primeira reação, com a utilização de iniciadores internos tem sido realizada (*nested* PCR) e tem como objetivo melhorar a sensibilidade da técnica convencional (Vidotto e Marana, 2001). Com isso, a capacidade de identificação é de apenas 30 hemácias infectadas por mL de sangue, o que facilita a identificação de animais portadores (Vidotto e Marana, 2001; Brito et al., 2010; OIE, 2012).

A PCR também tem se mostrado eficiente para diferenciação entre animais naturalmente infectados com *A. marginale* e animais vacinados com *A. centrale* (Molad et al., 2006), sendo a técnica de imunofluorescência indireta incapaz de distinguir anticorpos de ambas as espécies de *Anaplasma* devido à semelhança antigênica (Visser et al., 1992). A técnica vem sendo desenvolvida também de forma que não só *A. marginale* seja detectado, assim como *Babesia bovis* e *B. bigemina* (PCR multiplex), já que comumente são encontrados animais coinfectados com os três agentes (Figueroa et al., 1993).

Recentemente, a PCR em tempo real tem sido descrita para a identificação de *A. marginale* (Carelli et al., 2007). Duas vantagens dessa técnica, que utiliza um único tubo fechado para a amplificação e análise, são uma reduzida oportunidade para contaminação do fragmento amplificado e um resultado semiquantitativo. No entanto, o equipamento é de alto custo, requer manutenção preventiva e pode estar além da capacidade de alguns laboratórios. Os ensaios de PCR em tempo real podem ter com

alvo vários genes ou rRNA 16S e possuem nível de sensibilidade analítica equivalente à *nested* PCR (OIE, 2012). Além disso, podem ser empregados na detecção e quantificação da riquetsemia no animal portador e nos animais sem e com sinais clínicos, na correlação entre os níveis de riquetsemia e os sinais clínicos, na avaliação da eficiência de vacinas e de tratamentos com drogas (Carelli et al., 2007).

O sequenciamento genético de amostras positivas na PCR é uma ferramenta complementar, a qual permite confirmar o diagnóstico do produto amplificado, comparando as sequências depositadas em bancos de dados, além de permitirem o desenvolvimento de estudos filogenéticos (Hillis et al., 1996). Para isso, programas de bioinformática são utilizados na realização da coleta, organização e análise das sequências, seja ela de DNA ou de proteínas. A identificação das sequências de DNA ou proteínas que possuem similaridade entre si, pode ser realizada através do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, que compara a sequência alvo com aquelas depositadas no banco de dados, *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Lesk, 2008). De acordo com Silveira (2012), diversos programas que são responsáveis pela análise da qualidade das sequências e pela formação de *Contigs* (sobreposição de fragmentos de DNA derivados de uma mesma fonte genética) estão reunidos em alguns *softwares*, como o desenvolvido pela “Embrapa Genetic and Biotechnology” – *Electropherogram quality analysis* (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>).

Adicionalmente, os *softwares* MEGA (Tamura et al., 2011) e CLUSTALW permitem a observação da similaridade entre as sequências de DNA através da realização dos seus múltiplos alinhamentos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho pertenceu a um conjunto de pesquisas submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG sob protocolo nº 41/2006, com validade até 14/06/2013.

O experimento foi dividido em duas fases. A fase experimental I consistiu na identificação de animais infectados com *A. marginale* ao nascimento, seguido de isolamento, sequenciamento genético e caracterização da

amostra. Na fase experimental II, o objetivo foi verificar a virulência da amostra de *A. marginale* isolada da transmissão vertical através de inoculação experimental em bezerros livres da infecção por hemoparasitos (Figura 2).

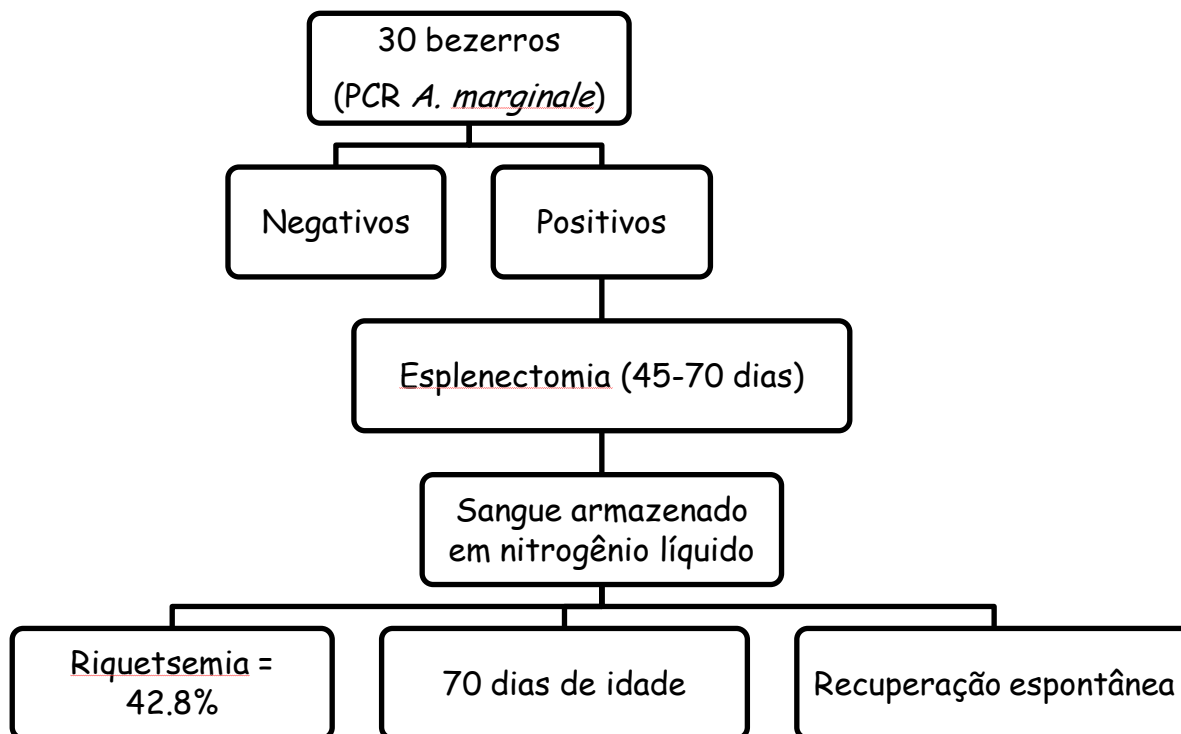


Figura 2. Organograma da metodologia de identificação e isolamento de *A. marginale* de origem congênita em bezerros recém-nascidos

3.1. Fase experimental I

3.1.1. Animais experimentais

Trinta bezerros da raça Holandês Preto e Branco (HPB), recém-nascidos, foram adquiridos de uma fazenda de gado leiteiro, no município de Inhaúma-MG, localizada a 85 km de Belo Horizonte. Na fazenda, os animais receberam 4L de colostro, em duas refeições, 2L até 2h após o nascimento e 2L entre seis e 12h após o primeiro fornecimento. A partir do segundo dia de vida, os animais receberam 4L de leite dia⁻¹, divididos em duas refeições de 2L. Eles foram alojados em baias coletivas com cama de feno, garantindo a ausência de contato com carrapatos. Os animais permaneceram no máximo três dias na propriedade quando foram

levados para a Escola de Veterinária (EV) – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Ao chegarem, os animais foram alojados nas instalações da Clínica de Ruminantes – Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV). As instalações consistiam em um galpão de alvenaria aberto nas laterais, as quais foram fechadas com telas, evitando a entrada de moscas. Periodicamente as telas foram pulverizadas com cipermetrina¹ e em alguns pontos do galpão foram colocadas iscas de mosquicida² para o controle de moscas no ambiente. Os bezerros permaneceram em baias

¹Flytick® – Vallée

²Agita®10 WG – Novartis Animal Health

coletivas (dois animais/baia) contendo serragem no piso, a qual era trocada três vezes por semana.

Os animais foram alimentados com 6L de leite em pó reconstituído³ (130g L⁻¹) por um período de 30 dias e, em seguida, 4L, por mais 15 dias, divididos em duas refeições de 3L e 2L cada, respectivamente, uma às 07h e outra às 15h. Ração concentrada com 18% de proteína bruta (PB) foi fornecida *ad libitum* desde a chegada dos animais à EV-UFGM até o desmame (45 dias após), o qual foi realizado de forma abrupta. Uma semana antes do desmame, silagem de milho foi introduzida separadamente na dieta *ad libitum*. Após a retirada do leite, forneceu-se o concentrado sobre a silagem de milho por uma semana em quantidade limitada a 2 kg dia⁻¹, divididos em duas refeições. A partir da segunda semana pós-desmame, a ração passou a ser misturada completamente à silagem. Adicionalmente, 20g de suplemento mineral⁴ foi misturado ao concentrado e os animais tinham acesso à água *ad libitum*.

Os bezerros foram pulverizados semanalmente com cipermetrina⁵ (2L de calda animal¹) até o final do período experimental para assegurar que os mesmos não entrassem em contato com moscas e carrapatos.

3.1.2. Isolamento do *Anaplasma marginale*

Amostras de sangue foram coletadas com anticoagulante (EDTA) no dia da chegada dos bezerros à EV-UFGM. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Protozoologia Veterinária – Departamento de Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – UFGM para extração de DNA e posterior realização de diagnóstico para *A. marginale* por *nested* PCR (nPCR) utilizando o gene *msp4*. Os animais detectados como positivos foram esplenectomizados entre 45 e 70 dias de idade e acompanhados através da temperatura retal, apetite, volume globular (VG) e esfregaço

³ Leite em pó integral (ingrediente para alimentação animal) – Itambé®

⁴ Suplemento mineral RumimasterPhós 85® – Rumimaster

⁵ Flytick® – Vallée

sanguíneo. PCR convencional com alvo no gene *msp1a* também foi realizada nos animais positivos.

De um dos animais esplenectomizados, apresentando riquetsemia de 42,8%, de 70 dias de idade e que se recuperou espontaneamente, foi coletado amostra de sangue, de forma asséptica, em tubo contendo EDTA através da punção da veia jugular. O sangue foi centrifugado a 2G, por 10 minutos, e o plasma e a capa de leucócitos descartados. A papa de hemácias foi ressuspensa em tampão fosfato (PBS), na qual foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (vol/vol) como substância crioprotetora. O material foi alíquotado em ampolas de 1,8 mL assepticamente em capela de fluxo laminar e mantido em nitrogênio líquido. Desse animal, novo nPCR e PCR convencional foram realizados após a esplenectomia.

Nos animais esplenectomizados que atingiram VG ≤ 10%, realizou-se o tratamento à base de 7,5mg kg⁻¹ de enrofloxacin⁶, via intravenosa, dose única (Facury Filho et al., 2012).

• **Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

a. *Extração de DNA*

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada através de um *kit* comercial⁷ de acordo com as recomendações do fabricante para extração de DNA em volume de 300µL de sangue total.

b. *Amplificação do DNA*

A amplificação do DNA extraído foi realizada por meio de termociclador automático⁸. Na Tabela 2 são apresentados os iniciadores e os produtos de cada reação. Os programas utilizados encontram-se demonstrados na Tabela 3. A condição para a nPCR e PCR convencional estão presentes na Tabela 4.

a. *Observação das bandas*

⁶ Kinetomax® – Bayer Saúde Animal

⁷ Wizard Genomic DNA Purification Kit® – Promega

⁸ Mastercycler® – Eppendorf

Os produtos das reações foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% corados com *GelRed*, possibilitando a observação de bandas

com pesos moleculares correspondentes aos da banda alvo (294 e 800 pb para *msp4* e *msp1a*, respectivamente).

Tabela 2. Sequência de iniciadores e produtos de cada reação para identificação de *A. marginale*

Reação	Sequência (5' para 3')	Iniciador	Alvo	Produto (pb)	Referência
1ª reação (nested)	GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC	MSP45 MSP43	<i>msp4</i>	872	de la Fuente et al. (2008)
2ª reação (nested)	CGCCAGCAAACCTTTTCCAAA ATATGGGGACACAGGCAAAT	AnapF AnapR	<i>msp4</i>	294	Silveira et al. (2012)
Convencional	TGTGGTTGTCTCTTTCCCGATGT CACCGCCAAACATGAAGTCGACAA	MSP1aNF MSP1aNR	<i>msp1a</i>	800	Bastos et al. (2009)

Tabela 3. Programas utilizados para realização de *nested* PCR e PCR convencional para identificação de *A. marginale*

PCR	Ciclo	Passo	Temperatura (°C)	Duração	Alvo
<i>Nested</i>	1 (1x)	Desnaturação inicial	94	5 min	<i>msp4</i>
	2 (29x)	Desnaturação	92	1 min	
		Anelamento	54	1 min	
		Extensão	72	2 min	
		Extensão final	72	8 min	
	4	<i>Hold</i>	12	---	
Convencional	1 (1x)	Desnaturação inicial	94	5 min	<i>msp1a</i>
	2 (35x)	Desnaturação	94	30 seg	
		Anelamento	60	1 min	
		Extensão	72	30 seg	
		Extensão final	72	5min	
	4	<i>Hold</i>	18	---	

Tabela 4. Condição para nPCR e PCR convencional com alvo nos genes *msp4* e *msp1a*, respectivamente, utilizando os *primers* MSP45/3 e MSP1aNF/R

Reagente	Volume (µL): 1ª reação (<i>msp4</i>)	Volume (µL): 2ª reação (<i>msp4</i>)	Volume (µL): <i>msp1a</i>
H ₂ O MilliQ	10,05	16,75	16,75
Tampão IB (1X)	1,5	2,5	2,5
dNTP (10 mM)	1,2	2,0	2,0
Mix <i>primer</i> (F+R) (10mM)	0,6	1,0	1,0
Taq polimerase (5U µL ⁻¹)	0,15	0,25	0,25
DNA/produto 1ª reação	1,5	2,5	2,5
Volume final	15	25	25

3.1.3. Sequenciamento genético e caracterização dos isolados

Os produtos de PCR das amostras positivas para *A. marginale* foram purificados por meio de Polietilenoglicol (PEG)

(www.icb.ufmg.br/lbem) e encaminhados para sequenciamento genético em duplicata, uma para utilização de iniciador direto e outra para o reverso utilizando-se *kit* específico⁹ em um

sequenciador automático de DNA¹⁰. Além disso, utilizou-se o MEGA 5.0 *software* para alinhar as sequências e traduzir em aminoácidos para a realização das análises dos *tandem* (Tamura et al., 2011).

A qualidade das sequências obtidas foi analisada e os *Contigs* foram formados com o auxílio do programa *Electropherogram quality analysis*, desenvolvido pela Embrapa Genetic Resource and Biotechnology

⁹BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit[®] - Life Technologies

¹⁰ABI 3130[®] – Life Technologies

(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Posteriormente, as sequências foram comparadas com sequências depositadas em banco de dados utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Por fim, as sequências analisadas foram caracterizadas de acordo com o grau de similaridade com os dados contidos no *Genbank*.

3.2. Fase experimental II

3.2.1. Animais experimentais

Nesta fase experimental, foram utilizados oito bezerros, dos 30 animais utilizados na fase experimental I, negativos para *A. marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina*, determinado através de PCR, com idades entre 90 e 110 dias (Figura 3). Esses animais permaneceram em instalações do tipo *tie stall*, com piso contendo tapete de borracha, as quais eram higienizadas diariamente. Eles foram alimentados conforme descrito anteriormente com silagem de milho *ad libitum* e 2 kg dia⁻¹ de ração, em duas refeições diárias, em forma de mistura total.



Figura 3. Animais utilizados no experimento alojados em sistema *tie stall*

3.2.2. Inoculação do isolado nos animais experimentais

Seis, dos oito bezerros, foram inoculados, via intravenosa, com 2×10^7 hemácias infectadas com a amostra criopreservada de *A. marginale* de transmissão vertical, denominada de UFMG3. Os outros dois animais foram

mantidos como controles negativos, para certificar ausência de transmissão no local.

3.2.3. Acompanhamento dos animais experimentais

Os bezerros foram monitorados por um período total de 61 dias. Exame físico foi realizado

diariamente após a alimentação da manhã e consistiu na avaliação das seguintes variáveis:

- Temperatura retal (TR - °C);
- Frequência cardíaca (FC – batimentos por minuto = bpm);
- Frequência respiratória (FR – movimentos respiratórios por minuto = mpm);
- Movimentos ruminais (movimentos em 5 minutos = mov./5min);
- Escore clínico (Tabelas 5 e 6).

Volume globular (VG) e esfregaço sanguíneo foram realizados a cada 48h desde o momento imediatamente anterior à inoculação até o aparecimento das primeiras hemácias infectadas com *A. marginale* (período de incubação - PI). A partir deste dia, esses exames foram realizados diariamente durante 22 dias, e posteriormente, a cada 48h até o fim do período experimental, que se deu quando os valores médios do VG corresponderam a 24%, considerado limite inferior de normalidade (Radostits et al., 2007). O período de patência (PP) foi considerado o intervalo de tempo da

deteção das primeiras hemácias infectadas de *A. marginale* até o dia de menor VG; e o período de convalescença (PC) o intervalo de tempo obtido a partir do dia de menor VG até o dia no qual o VG foi igual a 24%.

Tabela 5. Componentes e classificação do escore clínico e peso adotado para cada componente

Componentes	Classificação	Peso
Comportamento	0 – normal	2
	1 – apático	
	2 – deprimido	
Apetite	0 – normal	2
	1 – reduzido	
	2 – ausente	
Mucosas	0 – normocoradas	2
	1 – hiperacoradas	
	2 – hipocoradas	
	3 – ictericas	
Desidratação	0 – normal	2
	1 – discreta	
	2 – moderada	
	3 – intensa	
Respiração	0 – eupneica	2
	1 – dispneica	
Fezes	0 – normais	1
	1 – amolecidas	
	2 – diarreicas	

Tabela 6. Interpretação do grau de comprometimento referente ao escore clínico

Grau	Mín/Máx	Normal	Discreto	Moderado	Intenso
Escore clínico	0 – 24	0 – 6	6,1 – 12	12,1 – 18	18,1 – 24

O volume globular foi realizado através da técnica de microhematócrito e os esfregaços sanguíneos foram corados pelo método de Romanowsky¹¹. A riquetemia foi determinada pela observação de 40 campos microscópicos dos esfregaços sanguíneos para a determinação do percentual de hemácias infectadas por *A. marginale* (IICA, 1987).

Os tempos de avaliação foram definidos tomando partida do primeiro dia de observação de hemácias infectadas de *A. marginale* nos esfregaços sanguíneos, considerando-o como dia 0 (zero). Anterior a este dia, atribuiu-se números negativos e posteriormente, números positivos variando de -20 a 40.

3.2.4. Dados meteorológicos

Durante a fase experimental II, dados meteorológicos foram colhidos da estação da Pampulha do Instituto Nacional de Meteorologia, com temperatura ambiente variando entre 10 e 26°C, umidade relativa do ar entre 23 e 83% e ausência de precipitação, excetuando-se um dia, no qual houve precipitação de 2mm.

3.3. Análises estatísticas

Na fase experimental I os dados foram analisados de forma descritiva. Na fase experimental II, o delineamento foi em bloco ao acaso, no qual os animais formaram o bloco. Os dados foram submetidos ao teste de Lilliefors para averiguação da normalidade e homoscedasticidade das amostras, no entanto os pressupostos não foram atendidos e, portanto, submeteu-se ao teste de Friedman para a observação da existência de diferenças entre os tempos (Sampaio, 2010) e em seguida, foram

¹¹Panótico Rápido LB® – Laborclin produtos para laboratórios LTDA

comparados pelo teste de Dunn (Pontes e Corrente, 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação de animais positivos e caracterização das cepas de *A. marginale*

A propriedade rural da qual foram adquiridos os bezerros experimentais constitui um rebanho leiteiro com reconhecida estabilidade enzoótica de *A. marginale*, não tendo notificação de ocorrência de casos de anaplasose nos animais adultos. Dos 30 bezerros recém-nascidos submetidos ao *nested* PCR para *msp4* de *A. marginale*, três (10%) foram diagnosticados positivos - bezerros 11 (Figura 4), 24 e 30. A análise no BLAST da sequência de amplificação para *msp4* apresentou alta similaridade (97-

99%) com cepas de *A. marginale* depositadas no *Genbank*. Esses animais positivos ao serem submetidos à caracterização molecular da MSP1a, através da análise de *tandem* dos produtos de genes, apresentaram variações entre os isolados. Os sequenciamentos de DNA realizados nos bezerros 11, 24 e 30 identificaram duas novas sequências de repetições, além das sequências 13, 18, Q e MGI19, já descritas (Tabela 7). Estes resultados demonstram a presença de diferentes genótipos de *msp1a* de *A. marginale* no rebanho, concordando com a observação que há alta diversidade genética de *A. marginale* nas áreas endêmicas em todo o mundo (de la Fuente et al., 2007).



Figura 4. Identificação de animal positivo em gel de agarose 1% após eletroforese com produto da *nested* PCR com alvo no *msp4*. PM – padrão molecular; 10-23 bezerros; C+ – controle positivo

Tabela 7. Comparação das sequências de repetições de MSP1a entre os bezerros positivos (11, 24 e 30) para *A. marginale*

Bezerro	Sequência codificada	Forma de repetição
	DDSSASGQQQESSVSSQSE-ASTSSQLG--	A*
11	T*****L***DQ*****	13 [*]
pré-esplenectomia	T*****L***DQ*****S***	18 [*]
11	AE*****L***DQ*****	MGI19**
pós-esplenectomia	AE*****L***DQ*****	
24	T*****L***DH*****	Não descrito
	T*****L***DQ*****S***	18 [*]
30	T*****G*****_*****	Não descrito
	A*****DQ*****	Q*

* Sequências relatadas por de la Fuente et al. (2007); ** Sequência observada por Silveira et al. (2012)

O encontro de DNA de *A. marginale* nas amostras de sangue dos bezerros recém-

nascidos é sugestivo da ocorrência da transmissão vertical da anaplasose. Como os

animais positivos não apresentaram riquetsemia detectável pelos esfregaços sanguíneos, optou-se pela esplenectomia para realizar a comprovação definitiva desta forma de transmissão. Após a esplenectomia, os três animais positivos desenvolveram riquetsemia patente além de manifestar a forma clínica da anaplasiose, com presença de febre, apatia, redução do apetite e anemia. Este fato confirma de modo irrefutável a ocorrência da transmissão vertical nos três bezerros.

Dois bezerros (24 e 30) desenvolveram anemia intensa, e ao atingirem $VG \leq 10\%$, foram tratados conforme descrito no protocolo CETEA. Isto ocorreu aos 18 e oito dias após a esplenectomia, quando as riquetsemias eram de 38,5% e 26,8%, respectivamente. O bezerro 11, uma semana após a esplenectomia, apresentou riquetsemia de 42,8% e VG mínimo de 11%, não havendo a necessidade de ser tratado. Além disso, esse animal era o de maior idade no momento da esplenectomia (70 dias) e, assim como os demais, não apresentou sinais clínicos da doença previamente. Tudo isso sugeriu que a amostra de *A. marginale* presente no bezerro 11 era de baixa virulência. Diferença de virulência de amostras de *A. marginale* oriundas de transmissão vertical tem sido descrita na literatura. Zaugg (1985), ao inocular sangue fetal positivo para *A. marginale* em bezerros esplenectomizados, observou o desenvolvimento de anaplasiose aguda em dois animais, os quais se recuperaram espontaneamente. Entretanto, Zaugg e Kuttler (1984) relataram a morte de dois bezerros com anaplasiose oriundos de vacas portadoras, que foram esplenectomizados após o nascimento. Adicionalmente, Pypers et al. (2011) relataram um caso de anaplasiose aguda e fatal em um bezerro coinfestado com BVDV, sugerindo que a imunossupressão causada pelo vírus foi fator predisponente à infecção. Por outro lado, a ausência de reação febril e outros sinais clínicos de anaplasiose em bezerros infectados congenitamente foram observados por Potgieter e Van Rensburg (1987), corroborando com os achados do presente estudo.

Pelo sequenciamento do gene *msp1a* do bezerro 11, verificou-se a ocorrência de diferenças entre os *tandem* antes e após a esplenectomia. Neste ínterim, possivelmente ocorreu alteração do

genótipo do isolado de *A. marginale*. Mudanças no genótipo de *A. marginale* também foram observadas por Bastos et al., 2010 após a inoculação do isolado UFMG2. Estes autores relataram a possibilidade da presença, em baixos níveis, do novo genótipo no estoque original da cepa UFMG2 e que esses níveis aumentaram apenas após a multiplicação nos animais infectados e a partir daí, detectado pela PCR. De forma alternativa, os autores descreveram que esta variação antigênica da MSP1a poderia ser o primeiro exemplo em animais infectados e explicaria, pelo menos, em parte, a geração de diversidade genética de *A. marginale* em regiões endêmicas.

Após a esplenectomia, o *tandem* do bezerro 11 apresentou 99% de identidade com a amostra I19 (acesso JN885132.1) no *Genbank*. Esta amostra foi isolada de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) no Brasil por Silveira et al. (2012). Silveira (2012), ao inocular uma amostra de veado-catingueiro (I5 – acesso JN022558.1) em bezerros esplenectomizados observou que os animais desenvolveram baixa riquetsemia, com ausência de sinais clínicos de anaplasiose, sugerindo que a amostra apresenta baixa virulência. Amostras de *A. marginale* isoladas de ruminantes selvagens tem sido descrita como sendo de baixa virulência para bovinos (Kuttler, 1984). Como o bezerro 11 recuperou o VG sem necessidade de tratamento, e a amostra apresentava indicativos de baixa virulência, sangue deste animal foi colhido e criopreservado para posterior realização de teste de virulência.

Os dados obtidos neste experimento comprovam que 10% dos 30 bezerros acompanhados, oriundos de uma propriedade de exploração leiteira no interior de Minas Gerais foram infectados verticalmente por *A. marginale*. Frequência similar foi observada por Potgieter e Van Rensburg (1987) na África do Sul, os quais verificaram transmissão vertical em 12,5% dos bezerros e por Grau (2006), no Sul do Rio Grande do Sul, que constatou a ocorrência de 10,5% de bezerros nascidos de vacas positivas na PCR. No entanto, foi superior aos dados de Ribeiro et al. (1995), que encontraram soroprevalência de 2,1% em fetos bovinos com idades estimadas entre 121 e 150 dias.

Quando as vacas sofrem anaplasnose clínica no último trimestre de gestação a taxa de transmissão vertical é elevada. Este fato tem sido descrito por Salabarría e Pino (1988) que verificaram transmissão vertical em 86,4% dos bezerros com até 24h de vida; Potgieter e Van Rensburg (1987) observaram ocorrência de 30,8% de bezerros infectados, enquanto Ribeiro et al. (1995) relataram que 36% dos bezerros neonatos, oriundos de vacas pré-imunizadas no terço final de gestação, apresentaram anticorpos anti-*Anaplasma*. Outros autores também relataram a transmissão vertical de *A. marginale* a fetos bovinos de vacas com infecção aguda durante a gestação (Swift e Paumer, 1976; Zaugg e Kuttler, 1984; Zaugg, 1985; Potgieter e Van Rensburg, 1987). Estas observações diferem dos dados apresentados neste experimento, no qual apenas 10% dos bezerros encontravam-se positivos para *A. marginale* até três dias após o nascimento. Possivelmente, isto se encontra relacionado ao fato de que o rebanho de origem dos animais em estudo apresenta alta incidência da doença em bezerras de 5-12 meses de idade, as quais se tornam cronicamente infectadas, não havendo registros de casos clínicos em bovinos adultos.

4.2. Inoculação de bezerros com amostra de *A. marginale* de transmissão vertical

4.2.1. Período de incubação, de patência e convalescente.

A amostra de *A. marginale*, isolada do bezerro 11 (UFMG3), ao ser inoculada em bovinos negativos para essa riquetsia na dose de 2×10^7 hemácias infectadas por animal, e com baço *in situ*, apresentou período de incubação (PI) de 20 dias. Período de incubação similar foi observado com a utilização da amostra de *A. marginale* de alta virulência (UFMG2), na dose 3×10^5 hemácias infectadas (Lasmar et al. 2012). Entretanto, Bastos et al. (2010), utilizando a amostra UFMG2 na dose de 10^7 hemácias infectadas por animal, verificaram PI de 13 dias, período este também observado por Rodríguez et al. (2000) utilizando um isolado do México (MEX-15) em bovinos de 18 meses de idade, numa dose de 10^8 hemácias infectadas por animal. Com uma dose de 10^7 hemácias infectadas, Benavides et al. (2000) observaram PI de 28 dias utilizando um isolado

aparentemente de baixa virulência em animais de 10 a 18 meses de idade. Variação do PI, relacionado com a dose infectante, foi relatada por Gale et al. (1996) que constataram que bovinos inoculados com 10^{10} , 10^8 e 10^6 hemácias infectadas por animal apresentaram PI de 7,3, 13,9 e 19,9 dias, respectivamente. Outro fator que interfere no PI está relacionado com a virulência da amostra. Coelho (2007), trabalhando com uma amostra de baixa virulência (UFMG1), na dose de 10^7 hemácias infectadas por animal, observou PI de 35 dias. O PI de 20 dias observado neste experimento, utilizando inóculo de 2×10^7 hemácias infectadas por animal sugere que a amostra isolada de transmissão vertical tem virulência inferior à UFMG2, sendo mais compatível com a UFMG1.

Quanto ao período patente (PP), correspondente ao início da riquetsemia até o dia de menor VG, a amostra UFMG3 apresentou PP de nove dias. Lasmar et al. (2012), ao desafiar animais vacinados com vacina inativada e bezerros não vacinados, com amostra de alta virulência (UFMG2) observaram PP de 10,4 e 12,3 dias, respectivamente. A falta de padronização dos critérios para definir os parâmetros do PP dificulta a comparação dos dados obtidos de diferentes amostras de *A. marginale*. Coelho (2007) observou PP de 25 dias para amostra de baixa virulência (UFMG1), mas considerou o PP desde a identificação das primeiras hemácias infectadas até a estabilização da riquetsemia inferior a 1%. Lasmar (2010) relatou um PP de 11,7 dias, utilizando amostra UFMG2 e considerando o período desde o início da riquetsemia até os animais atingirem 10% de VG. O PP observado neste experimento foi o mais curto quando comparado com outros trabalhos realizados com as amostras de *A. marginale* isoladas em Minas Gerais, embora utilizando, às vezes, parâmetros distintos.

O período de convalescença (PC), definido como o intervalo de tempo obtido a partir do dia de menor VG até o dia que o VG igual a 24%, foi de 31 dias e seu início se deu quando a riquetsemia se encontrava em 2,48%. Esse período foi superior ao observado por Coelho (2007), que verificou um PC de 25 dias em animais inoculados com a amostra UFMG1. No entanto, esse autor considerou PC a partir da

riquetsemia abaixo de 1%, que ocorreu 10 dias após o menor VG. Porém, utilizando a amostra UFMG2, Coelho (2007) e Lasmar et al. (2012), observaram período de convalescência de 10 dias e 9,3 dias, respectivamente, sendo justificado pelo tratamento dos animais quando atingiram $VG \leq 10\%$, o que possivelmente acelerou a recuperação dos mesmos. Um fator que contribuiu para o prolongamento do PC neste experimento foi a ocorrência de dois picos de ricketsemia nos animais experimentais com intervalo de 13 dias. Este intervalo condiz com o relatado por Kocan et al., (2003), que relataram variações a cada 10-14 dias. No entanto, de acordo com Kieser et al. (1990), as recidivas ocorrem em intervalos de aproximadamente cinco semanas após o PC e são atribuídas à ocorrência de variações

antigênicas nas MSP como mecanismo de evasão do sistema imune. Deve-se salientar que nenhum bezerro necessitou de tratamento e todos se recuperaram clinicamente.

4.2.2. Riquetsemia e volume globular

A cinética das riquetsemias de *A. marginale* nos bezerros inoculados com a amostra UFMG3 está apresentada na Figura 5 e na Tabela 8. Após PI de 20 dias, os animais apresentaram ricketsemia ascendente até o 6º dia, quando atingiu pico de 3,78%. A ricketsemia estabilizou até o 8º dia, quando começou redução gradativa até o 15º dia, apresentando 1,88%. Observa-se a partir desta data nova ascensão, atingindo o segundo pico de 5,1% no 19º dia, quando inicia novamente a redução.

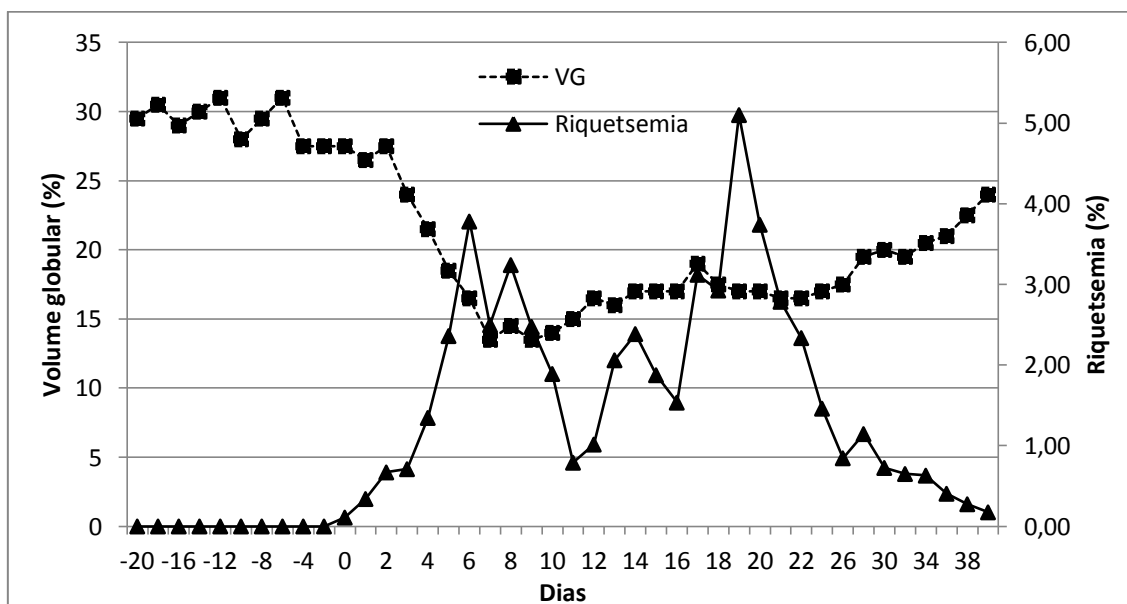


Figura 5. Dinâmica das medianas de VG e ricketsemia de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*

As maiores riquetsemias observadas nos bezerros experimentalmente inoculados com a amostra UFMG3 foram baixas, quando comparadas com riquetsemias provocadas por outras amostras isoladas de Minas Gerais. Coelho (2007) observou pico médio de 7,3% de ricketsemia com a amostra UFMG1, porém com a média ajustada em relação ao pico da anemia. Bastos et al. (2010) verificaram ocorrência de ricketsemia máxima de 5,4% e 10,2% em animais inoculados com $3,6 \times 10^7$ e 2×10^7 de

corpúsculos de *A. marginale* oriundos de cultivo em células IDE8 e de sangue infectado com o isolado UFMG1, respectivamente. Entretanto, quando foi utilizada amostra de alta virulência (UFMG2) foi constatada ricketsemia de 15,6% (Bastos et al., 2010). Com este mesmo isolado, porém com uma dose cerca de 100 vezes inferior, Lasmar et al. (2012) encontraram ricketsemia média máxima de 10,4%. Percebe-se semelhança do comportamento da ricketsemia do isolado UFMG3 com o da

amostra UFMG1, sugerindo a baixa virulência desse isolado.

Gale et al. (1996) testando doses infectantes de *A. marginale*, verificaram riquetsemia de 23,7, 14,7 e 8,7% em animais inoculados com 10^{10} , 10^8 e 10^6 hemácias infectadas, respectivamente. Assim, há possibilidade de utilizar menor dose infectante da amostra UFMG3 para obter menor riquetsemia nos animais experimentais.

Quanto ao volume globular, sofreu redução gradual após o início da riquetsemia, atingindo menores valores entre o 7º e 9º dia (13,5%). Posteriormente, teve o mesmo comportamento da riquetsemia, onde apresentou recuperação e nova redução no dia 21 com 16,5% (Figura 5 e Tabela 8). A redução do VG está intimamente relacionada com a virulência da amostra de *A. marginale* utilizada. Coelho (2007), trabalhando com amostra UFMG1, verificou menor média de VG de 13% no 8º dia do período de patência. Quando foi utilizada a amostra de alta virulência (UFMG2) nas doses de 5×10^7 e 3×10^5 hemácias infectadas por animal, respectivamente, Bastos et al. (2010) relataram redução média de 71% no VG (11,6%) e Lasmar et al. (2012) observaram $VG \leq 10\%$ em todos os animais experimentais, os quais necessitaram ser tratados. Além disso, Benavides et al. (2000) relataram redução do VG para valores inferiores a 15% após a inoculação de uma amostra descrita como de

aparente baixa virulência, sendo necessário o monitoramento dos animais após a vacinação.

A associação entre riquetsemia e redução do VG tem sido contraditória nas infecções experimentais de anaplasmoze bovina. Lasmar (2010) constatou a existência de correlação negativa entre VG e riquetsemia; entretanto, Gale et al. (1996) verificaram redução similar no VG independente da dose infectante e riquetsemia máxima atingida.

No presente experimento a dinâmica do VG e da riquetsemia ao longo do período experimental pode ser visualizada na Figura 5. O primeiro pico de riquetsemia ocorreu um dia antes (dia 6) do pico da anemia. Giardina et al. (1993) observaram que soros imunes de vacas infectadas por *Anaplasma* reagiram com as membranas das hemácias de bovinos infectados e normais, enquanto os soros de vacas não infectadas não reagiram, propondo que a infecção por *A. marginale* pode causar modificações estruturais e bioquímicas da membrana plasmática das hemácias, fazendo com que a anemia máxima ocorra entre 1-6 dias após o pico de riquetsemia. Meléndez (2005) também observou fagocitose de hemácias infectadas ou não por *A. marginale*, concluindo que há um mecanismo anticorpo dependente, participando da etiologia da anemia intensa usualmente observada durante a anaplasmoze.

Tabela 8. Medianas de riquetsemia e volume globular (VG) de bezerros inoculados experimentalmente com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*

DIA	-20	-12	-4	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	17	19	21	24	28	32	36	40
Riquetsemia (%)	0 d	0 d	0 d	0,11 cd	0,34 abcd	0,67 abcd	0,71 abcd	1,35 abcd	2,36 abc	3,78 ab	2,5 abc	3,24 A	2,48 abcd	1,89 abcd	0,79 abcd	2,06 abcd	1,88 abcd	3,12 abc	5,1 a	2,79 abc	1,46 abcd	1,15 abcd	0,65 abcd	0,41 abcd	0,18 bcd
VG (%)	29,5 a	31 ab	27,5 abc	27,5 abcd	26,5 abcd	27,5 abcd	24 e	21,5 e	18,5 e	16,5 e	13,5 e	14,5 e	13,5 e	14 e	15 de	16 cde	17 e	19 e	17 bcde	16,5 cde	17 e	19,5 e	19,5 e	21 e	24 e

Letras diferentes representam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tempos pelo teste de Dunn.

4.2.3. Parâmetros clínicos

Os animais inoculados com a amostra UFMG3 de *A. marginale* apresentaram temperatura retal (TR) acima de 39,0°C três dias após PI, quando a riquetsemia era de 0,71% e o VG de 24%. A TR atingiu pico de 40,2°C no 7º dia, quando atingiu o menor VG (13,5%) e um dia após o primeiro pico de riquetsemia (Anexo 1, Figura 6 e Tabela 9). Um outro pico foi observado no 18º dia (40,1°C), um dia antes do segundo pico de riquetsemia, percebendo-se, dessa forma, que a TR acompanhou a riquetsemia (Figura 6). A TR permaneceu elevada até o 32º dia, quando retornou à normalidade (Radostitis et al., 2007). De forma similar, Lasmar (2010) observou temperatura máxima de 40,7°C um dia antes do pico da anemia e da riquetsemia. Coelho (2007) observou correlação positiva entre a TR e a riquetsemia e a atribuiu à possível potencialização da indução de mediadores

inflamatórios através da ativação das células do sistema imune. De acordo com Feitosa (2008) pirógenos exógenos (vírus, bactérias, fungos, protozoários e antígenos) podem promover a liberação de citocinas ou de pirógenos endógenos (interleucina I e VI) que são armazenados e liberados pelos leucócitos, macrófagos, monócitos e células de Kupffer, alterando o ponto fixo do centro regulador. Isto leva a sinais além da hipertermia, como taquicardia, taquipnéia, perda de apetite e depressão (Feitosa, 2008). Neste estudo, taquicardia, taquipnéia, redução dos movimentos ruminais e aumento discreto do escore clínico também foram observados ao redor do primeiro pico de temperatura retal (Anexos 7-9 e Figura 8). A taquipnéia associada à febre auxilia a perda de calor pela respiração. Ademais, 10 a 15 bpm são aumentados para cada grau elevado na TR (Feitosa, 2008).

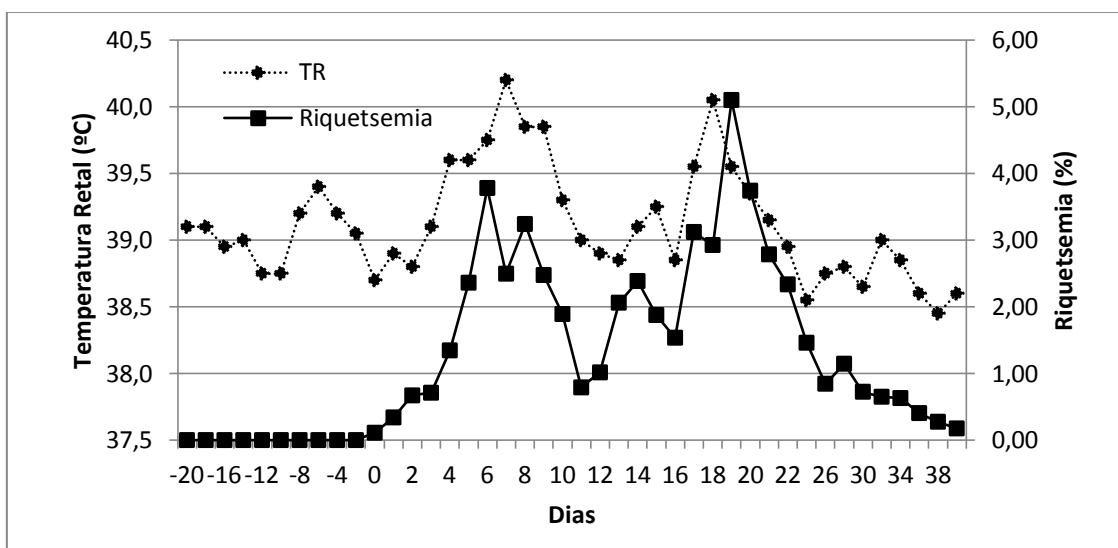


Figura 6. Dinâmica das medianas de temperatura retal e riquetsemia de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*

Apesar de se mostrar um bom indicador do desenvolvimento da riquetsemia, a febre não é um sinal específico (Feitosa, 2008) e demanda conhecimento da epidemiologia da doença na propriedade e o monitoramento nas categorias mais predispostas (Coelho, 2007).

A frequência cardíaca apresentou aumento significativo nos dias 7 e 8 comparado ao segundo dia de início da riquetsemia, atingindo

os maiores valores, 130 e 126 bpm, respectivamente. Isto ocorreu 1-2 dias anterior ao pico da anemia (Figura 7). Já ao final do período de monitoramento dos animais (dias 28, 32 e 40) ocorreu redução ($P < 0,05$), normalizando-se. Resultados semelhantes foram observados por Coelho (2007) e Lasmar (2010), que relataram maiores valores de FC no período de menores médias de VG, sendo justificados como um mecanismo de compensação da

anemia (Coelho, 2007). De acordo com Feitosa (2008), a taquicardia constitui uma

manifestação clínica da anemia.

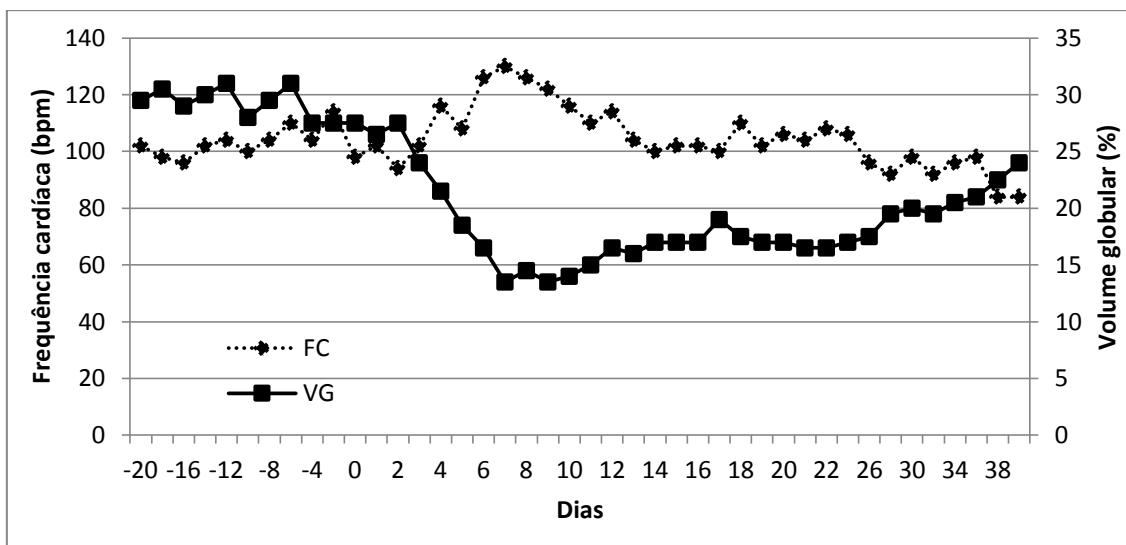


Figura 7. Dinâmica das medianas de frequência cardíaca e volume globular de bezerrinhos inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*

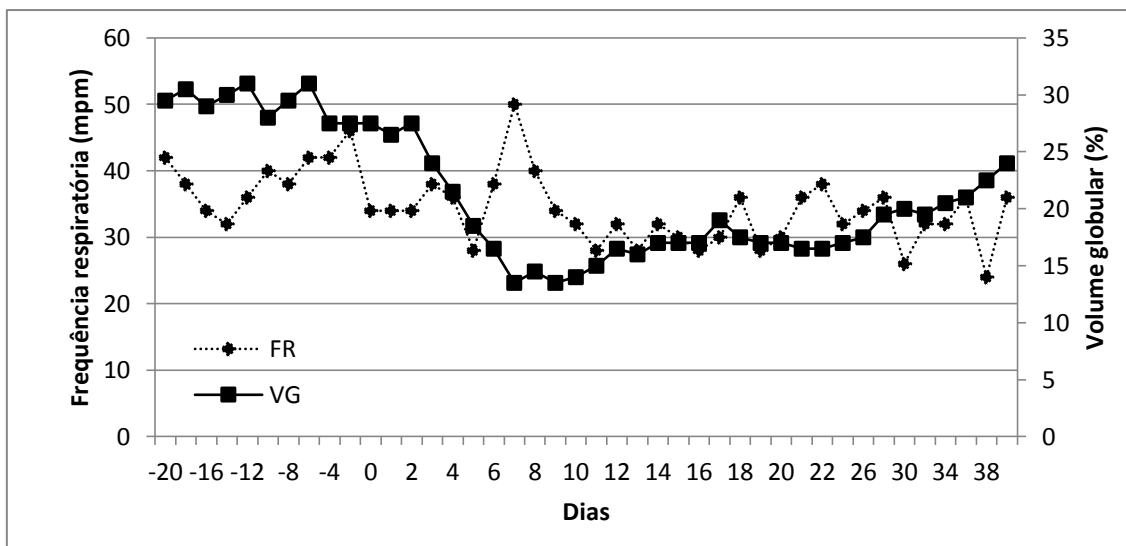


Figura 8. Dinâmica das medianas de frequência respiratória e volume globular de bezerrinhos inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*

A frequência respiratória não apresentou diferenças ($P>0,05$) entre os dias nos quais os animais foram monitorados. No entanto, o maior valor da FR (50 mpm) ocorreu no 7º dia após o início da riquetsemia (Figura 8), antecedendo em um dia o pico da anemia (Anexo 2 e Tabela 9). De forma mais evidente, Coelho (2007) e Lasmar (2010) verificaram

diferenças durante o período de maior fase da anemia, uma vez que as trocas gasosas e o transporte de oxigênio são deficientes em animais anêmicos, necessitando respirar com maior rapidez e profundidade para compensar a falha na oxigenação sanguínea (Feitosa, 2008). Isto foi demonstrado por Coelho (2007), o qual observou redução da pCO_2 com a evolução da

anemia causada pela infecção por *A. marginale* em bezerros inoculados experimentalmente, sendo justificada pelo aumento da frequência respiratória durante o período patente da anaplasiose. Adicionalmente, esse autor relatou a ocorrência de acidose metabólica, com redução do pH sanguíneo, estimulando a hiperventilação e conseqüentemente reduzindo a pCO_2 , na tentativa de manter o equilíbrio ácido-base.

Os movimentos ruminais apresentaram redução ($P < 0,05$) no 7º dia após início da riquetsemia (9 mov./5min). Apesar de não apresentar alterações significativas durante quase todo o período experimental, a diminuição ocorrida no dia 7, possivelmente se encontra relacionada à menor ingestão de alimento, uma vez que Feitosa (2008) relatou que o mais potente estímulo natural para o início das contrações ruminais é o ato da alimentação. De Andrade et al. (2004) observaram diminuição da ingestão de alimentos em bezerros pós-inoculação de *A.*

marginale. De forma interessante, no presente experimento, a redução dos movimentos ruminais ocorreu exatamente no dia de maior temperatura retal (Figura 9). Segundo Feitosa (2008), algumas doenças, principalmente as promotoras de febre, podem também levar à redução do apetite. Fato este observado por Rodríguez et al. (2000), os quais relataram a apresentação de sinais clínicos de anaplasiose aguda, incluindo anorexia e febre ($TR > 40^\circ C$) em animais inoculados com *A. marginale*.

O escore clínico dos bezerros inoculados com a amostra de origem congênita foi considerado normal durante todo o PI e até o 5º dia do PP. Apenas nos dias entre 6, 7 e 8, o escore clínico foi considerado discreto (Tabela 9). Em seguida, redução ($P < 0,05$) ocorreu no dia 36, permanecendo no último dia de monitoramento, o que demonstrou a melhora clínica dos animais. Sacco et al. (2001), em condições de campo, observaram poucos dos animais inoculados com sinais clínicos evidentes.

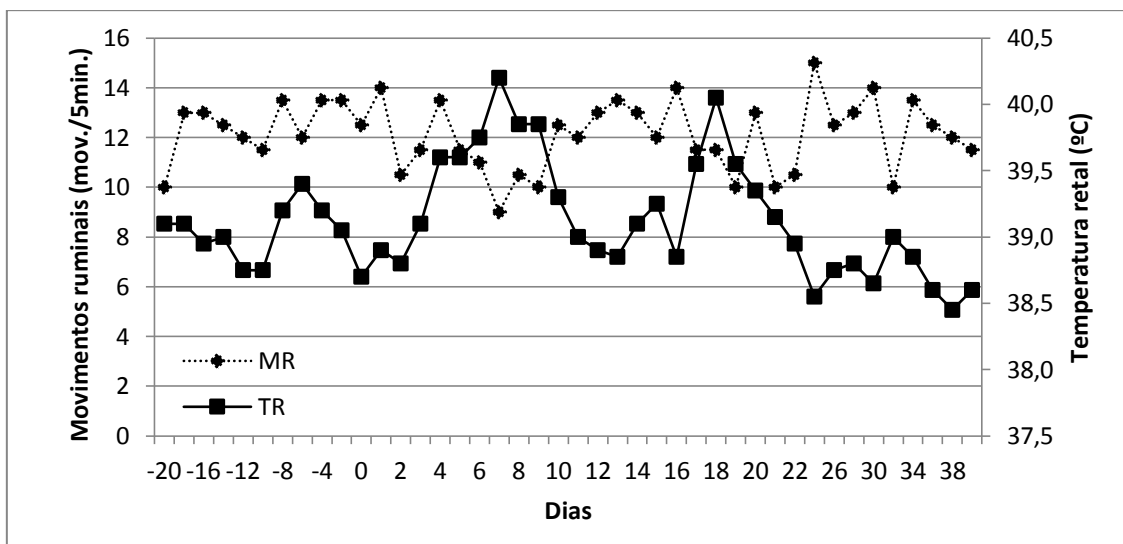


Figura 9. Dinâmica das medianas dos movimentos ruminais e temperatura retal de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.

Adicionalmente, Coelho (2007), ao adotar uma classificação para o escore de exame físico como normal ou moderado ou grave, verificou um escore moderado em um dos seis animais, enquanto os demais apresentaram apenas mucosas hipocoradas. Esse autor atribuiu esses achados às excelentes condições de instalação e à restrição de movimentação, uma vez que os

animais foram criados em sistema *tie stall*. Condições semelhantes também ocorreram neste experimento. Em condições de campo, os efeitos da anemia poderiam ser agravados e os sinais clínicos serem mais evidentes (Coelho, 2007). Entretanto, Rodríguez et al. (2000) observaram sinais clínicos evidentes, com morte de dois animais após inoculação de 10^8

hemácias infectadas por animal e Bastos et al. (2010) verificaram 60% de mortalidade em bezerros inoculados com um isolado de alta virulência. A dinâmica do escore clínico junto

às oscilações do VG e da riquetsemia pode ser visualizada na Figura 10.

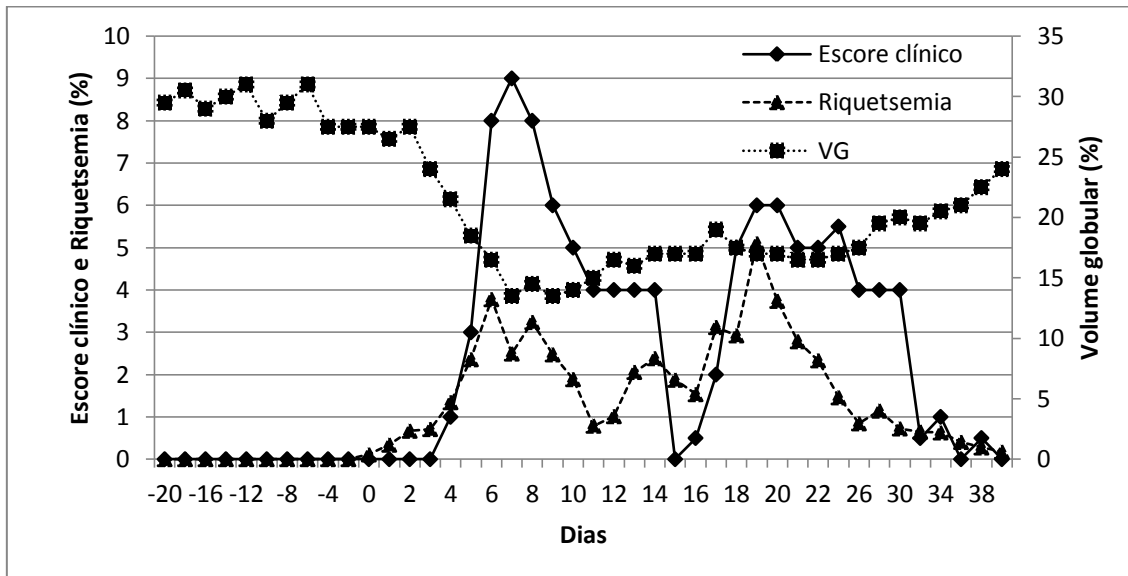


Figura 10. Dinâmica das medianas do escore clínico, volume globular e riquetsemia de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.

Tabela 9. Medianas de temperatura retal (TR), frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), movimentos ruminais (MR) e escore clínico de bezerros inoculados experimentalmente com isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*

DIA	-20	-12	-4	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	15	17	19	21	24	28	32	36	40
TR (°C)	39,1 abcd	38,8 bcd	39,2 abcd	38,7 abcd	38,9 abcd	38,8 bcd	39,1 abcd	39,6 abcd	39,6 abcd	39,8 abc	40,2 a	39,9 ab	39,9 abc	39,3 abcd	39 abcd	38,9 abcd	39,3 abcd	39,6 abcd	39,6 abcd	39,2 abcd	38,6 bcd	38,8 abcd	39 abcd	38,6 d	38,6 cd
FC (bpm)	102 abc	104 abc	104 abc	98 abc	102 abc	94 bc	102 abc	116 abc	108 abc	126 ab	130 a	126 a	122 ab	116 ab	110 abc	104 abc	102 abc	100 abc	102 abc	104 abc	106 abc	92 bc	92 bc	98 abc	84 c
FR (mpm)	42 a	36 a	42 a	34 a	34 a	34 a	38 a	36 a	28 a	38 a	50 a	40 a	34 a	32 a	28 a	28 a	30 a	30 a	28 a	36 a	32 a	36 a	32 a	36 a	36 a
MR (mov./5min)	10 ab	12 ab	13,5 ab	12,5 ab	14 a	10,5 ab	11,5 ab	13,5 a	11,5 ab	11 ab	9 b	10,5 ab	10 ab	12,5 ab	12 ab	13,5 ab	12 ab	11,5 ab	10 ab	10 ab	15 a	13 ab	10 ab	12,5 ab	11,5 ab
Escore Clínico	0 b	0 b	0 b	0 ab	0 b	0 ab	0 ab	1 ab	3 ab	8 ab	9 ab	8 a	6 ab	5 ab	4 ab	4 ab	0 ab	2 ab	6 ab	5 ab	5,5 ab	4 ab	0,5 ab	0 b	0 b

Letras diferentes representam diferença significativa (P<0,05) entre os tempos pelo teste de Dunn.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, a identificação de bezerros neonatos positivos para *Anaplasma marginale* através da técnica de PCR foi bastante efetiva, uma vez que todos os animais positivos se tornaram doentes após a esplenectomia.

A ocorrência de transmissão vertical em bezerros oriundos de um rebanho caracterizado por estabilidade enzoótica foi relativamente alta, considerada uma forma de transmissão importante e podendo ser uma fonte de perdas no rebanho, usualmente não diagnosticada.

A caracterização molecular de uma das amostras isoladas de bezerros com infecção vertical de *A. marginale* mostrou-se similar a amostra isolada de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) depositada no Genbank. Adicionalmente, os diferentes genótipos de *msp1a* isolados permitem a observação de alta diversidade genética de *A. marginale* no rebanho de origem desses animais.

A virulência da amostra estudada foi baixa, caracterizada por reduzida riquetsemia, recuperação espontânea dos animais e semelhanças com a cepa de baixa virulência, UFMG1, podendo ser utilizada como vacina viva. No entanto, acredita-se que os sinais clínicos podem ser menos intensos e a recuperação mais rápida com a redução da dose infectante utilizada, considerada elevada neste experimento.

Além do volume globular e riquetsemia, a temperatura retal constitui um bom parâmetro de monitoramento de animais infectados por *A. marginale*, correspondendo à forma mais prática para ser utilizada a campo.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem concluir:

A transmissão vertical de *Anaplasma marginale* ocorre com relativa frequência em bovinos.

Diferentes isolados de *A. marginale* são capazes de serem transmitidos verticalmente em bovinos.

A amostra de *A. marginale* UFMG3, utilizada neste trabalho, possui ampla semelhança com uma cepa isolada de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*).

A virulência da amostra UFMG3 mostrou-se baixa, podendo ser utilizada como vacina viva.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

BASTOS, C.V.; PASSOS, L.F.M.; 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. J. Microb.*, v. 9, p. 399-403, 2009.

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

BENAVIDES, E.; VIZCAINO, O.; BRITTO, C.M. Attenuated trivalent vaccine against babesiosis and anaplasmosis in Colombia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 916, p. 613-616, 2000.

- BENESI, F.J.; HOWARD, D.L.; SÁ, C.S.C. et al. Relato de um caso de transmissão transplacentária de anaplasmoze bovina. Observações clínico-laboratoriais. *R. Bras. Ci. Vet.*, v. 6, p. 175-176, 1999.
- BIRD, J.E. Neonatal anaplasmosis in a calf. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v. 44, p. 69-70, 1973.
- BOCK, R.E.; DE VOS, A.J. Immunity following use of australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust. Vet. J.*, v. 79, p. 832-839.
- BOWIE, J.V.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M. et al. Conservation of major surface protein 1 genes of ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. *Gene*, v. 282, p. 95-102, 2002.
- BRITO, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S.; ROCHA, R.B. et al. *Anaplasma marginale* infection in cattle from south-western Amazonia. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 30, p. 249-254, 2010.
- BROCK, V.W.; KLIEWER, I.O.; PEARSON, C.C. A vaccine for anaplasmosis. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v. 147, p. 948-951, 1965.
- BROWN, W.C.; SHKAP, V.; ZHU, D. et al. CD4⁺ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect. Immun.*, v. 66, p. 5406-5413, 1998.
- BROWN, W.C.; PALMER, G.H.; LEWIN, H.A. et al. CD4⁺ T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. *Infect. Immun.*, v. 69, p. 6853-6862, 2001.
- BROWN, W.C. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: implications for bacterial persistence. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 35, p. 241-252, 2012.
- CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A. et al. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Vet. Microbiol.*, v. 124, p. 107-114, 2007.
- CARREÑO, A.D.; ALLEMAN, A.R.; BARBET, A.F. et al. *In vivo* endothelial cell infection by *Anaplasma marginale*. *Vet. Pathol.*, v. 44, p. 116-118, 2007.
- COELHO, L.C.T. *Anaplasmoze bovina: parâmetros clínicos e de patologia clínica em bezerras infectados experimentalmente*. 2007. 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- DARK, M.J.; AL-KHEDERY, B.; BARBET, A.F. Multistrain genome analysis identifies candidate vaccine antigens of *Anaplasma marginale*. *Vaccine*, v. 29, p. 4923-4932, 2011.
- DE ANDRADE, G.M.; MACHADO, R.Z.; VIDOTTO, M.C. et al. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the Jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 1026, p. 257-266, 2004.
- DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F. et al. Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Anim. Health Res. Rev.*, v. 2, p. 163-173, 2001.
- 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. *Vet. Microbiol.*, v. 89, p. 239-251, 2002.
- DE LA FUENTE, J.; RUYBAL, P.; MTSHALI, M.S. et al. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Vet. Microbiol.*, v. 119, p. 382-390, 2007.
- DE LA FUENTE, J.; RUIZ-FONS F.; NARANJO, V. et al. Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus*

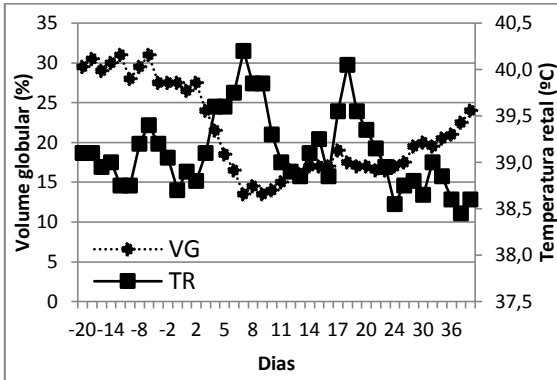
- capreolus*) from southern Spain. *Res. Vet. Sci.*, v. 84, p. 382-386, 2008.
- DENNIS, R.A.; O'HARA, P.J.; YOUNG, M.F. et al. Neonatal immunohemolytic anemia and icterus of calves. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v. 156, p. 1861-1869, 1970.
- FACURY FILHO, E.J.; CARVALHO, A.U.; FERREIRA, P.M. et al. Effectiveness of enrofloxacin for the treatment of experimentally-induced bovine anaplasmosis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 21, p. 32-36, 2012.
- FEITOSA, F.L.F. 2ª ed. *Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico*. São Paulo: Roca, 2008. 754p.
- FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S. et al. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol.*, v. 50, p. 69-81, 1993.
- GALE, K.R.; LEATCH, G.; GARTSIDE, M. et al. *Anaplasma marginale*: failure of sera from immune cattle to confer protection in passive transfer experiments. *Parasitol. Res.*, v. 78, p. 410-415, 1992.
- GALE, K.R.; DIMMOCK, C.M.; GARTSIDE, M. et al. *Anaplasma marginale*: detection of carrier cattle by PCR-ELISA. *Int. J. Parasitol.*, v. 26, p. 1103-1109, 1996a.
- GALE, K.R.; LEATCH, A.J.; DEVOS, A.J. *Anaplasma marginale*: effect of challenge of cattle with varying doses of infected erythrocytes. *Int. J. Parasitol.*, v. 26, p. 1417-1420, 1996b.
- GIARDINA, S.; ASO, P.M.; BRETANA, A. Antigen recognition on *Anaplasma marginale* and bovine erythrocytes: an electron microscopy study. *Vet. Immun. Immunopathol.*, v. 38, p. 183-191, 1993.
- GONÇALVES, R.C.; SILVA, D.P.G.; CHIACCHIO, S.B. et al. Anaplasmosis neonatal em bezerro. *Vet. Not.*, v. 11, p. 95-98, 2005.
- GRAFIAS, C.R.B.; ALVA, G.P.; AZOULAY, Y.R. et al. Estudio de la respuesta inmune humoral y celular em la infección y reinfección experimental de bovinos com *Anaplasma marginale*. *Vet. Méx.*, v. 34, p. 247-259, 2003.
- GRAU, H.E.G. *Transmissão transplacentária de Anaplasma marginale (Theiler, 1910) em bovinos do Sul do Rio Grande do Sul*. 2006. 54f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- GRISI, L.; MASSARD, C.L.; BORJA, G.E.M. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, v. 21, p. 8-10, 2002.
- GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.*, v. 57, p. 109-119, 1995.
- HILLIS, D.M.; MABLE, B.K.; LARSON, A. et al. Nucleic acids IV: sequencing and cloning. In: HILLIS, D.M.; CRAIG, M.; MABLE, B.K. ed. *Molecular Systematics*. Massachusetts: EDITION SINAUER ASSOCIATES INC SUNDERLAND, 1996. p. 321-337.
- IICA – Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. *Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina*, San José, Costa Rica, 1987.
- KESSLER, R.H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Bras.* v. 21, p. 177-179, 2001.
- KIESER, S.T.; ERIKS, I.S.; PALMER, G.H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect. Immun.*, v. 58, p. 1117-1119, 1990.
- KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A.A. et al. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.
- KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, F.J.; BLOUIN, E.F. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* v. 167, p. 95-107, 2010.

- KUTTLER, K.L. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. *J. Wildl. Dis.*, v. 20, p. 12-20, 1984.
- LASMAR, P.V.F. *Avaliação de vacinas inativadas de Anaplasma marginale produzidas a partir de cultivo celular em células IDE8 e acompanhamento clínico*. 2010. 71f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LASMAR, P.V.F.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J. et al. Evaluating the effectiveness of an inactivated vaccine from *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 21, p. 112-117, 2012.
- LESK, A.M. ed. *Introdução à bioinformática*. Porto Alegre: Artmed, 2008. 384p.
- MARANA, E.R.M.; DIAS, J.A.; FREIRE, R.L. et al. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná, Brasil, por um teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1. *Res. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 18, p. 20-26, 2009.
- MELÉNDEZ, R.D. Phagocytosis of *Anaplasma marginale* infected and uninfected erythrocytes by bovine peripheral blood leucocytes. *Rev. Cient. FCV-LUZ*, v. XV, p. 305-309, 2005.
- MELO, V.SP. *Infecção natural por Anaplasma marginale em bezerras de fazendas leiteiras da região metalúrgica, Minas Gerais*. 1999. 30f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MELO, V.S.P.; PASSOS, L.M.F.; FACURY FILHO, E.J. et al. Natural infection of calves by *Anaplasma marginale* in dairy cattle herds of the Metalúrgica region, Minas Gerais. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 21, p. 146-150, 2001.
- 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.
- MUNDERLOH, U.G.; LYNCH, M.J.; HERRON, M.J. et al. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet. Microbiol.*, v. 101, p. 53-64, 2004.
- NORTON, J.H.; PARKER, R.J.; FORBES-FAULKNER, J.C. Neonatal anaplasmosis in a calf. *Aust. Vet. J.*, v. 60, p. 348, 1983.
- OIE. Bovine anaplasmosis. In: MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS 2012, 2012. Disponível em: <www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.01_BOVINE_ANAPLASMOSIS.pdf> Acessado em: 03 jan 2013.
- OLIVEIRA, A.A.; DE PEDREIRA, P.A.S.; ALMEIDA, M.F.R. Doenças de bezerra. II Epidemiologia da anaplasmosse no estado de Sergipe. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 44, p. 377-386, 1992.
- PAINE, G.D.; MILLER, A.S. Anaplasmosis in a newborn calf. *Vet. Rec.*, v. 100, p. 58, 1977.
- PALMER, G.H. The highest priority: what microbial genomes are telling us about immunity. *Vet. Immunol.*, v. 85, p. 1-8, 2002.
- PASSOS, L.M.F.; LIMA, J.D. Diagnóstico de anaplasmosse bovina congênita em Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 36, p. 743-744, 1984.
- PAYNE, R.C.; OSORIO, O.; YBANES, A. Tick-borne diseases of cattle in Paraguay. II. Immunization against anaplasmosis and babesiosis. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 22, p. 101-108, 1990.
- PONTES, A.C.F.; CORRENTE, J.E. Comparações múltiplas não-paramétricas para o delineamento com um fator de classificação simples. *Rev. Mat. Estat.*, v. 19, p. 179-197, 2001.
- POTGIETER, F.T.; VAN RENSBURG, L. The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies

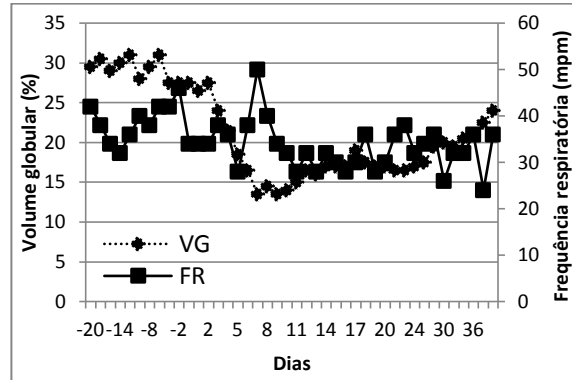
- and incidence of *in utero* transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v. 54, p. 557-560, 1987.
- PYPERS, A.R.; HOLM, D.E.; WILLIAMS, J.H. Fatal congenital anaplasmosis associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in a crossbred calf. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, v. 82, p. 179-182, 2011.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. et al. 10th ed. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. Edinburgh: Saunders Elsevier, 2007. 2156p.
- RIBEIRO, M.F.B.; REIS, R. Prevalência de anaplasmosose em quatro regiões do estado de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v. 33, p. 57-62, 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 a 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. Zootec.*, v. 47, p. 297-304, 1995.
- RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.*, v. 61, 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, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v. 70, p. 271-277, 1997.
- RIBEIRO, M.F.B.; FACURY FILHO, E.J.; PASSOS, L.M.F. et al. Uso de inóculo padronizado de *Anaplasma marginale* e da quimioprofilaxia no controle da anaplasmosose bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 55, p. 21-26, 2003.
- RODRÍGUEZ, S.D.; GARCÍA ORTIZ, M.A.; HERNANDEZ SALGADO, G. et al. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 23, p. 239-252, 2000.
- SACCO, A.M.S.; KESSLER, R.H.; MADRUGA, C.R. Cepas atenuadas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e de *Anaplasma marginale* como imunógenos no controle da tristeza parasitária bovina. *Ciência Rural*, v. 31, p. 849-855, 2001.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3 ed. Belo Horizonte: FEPMVZ. 264p. 2010.
- SALABARRIA, F.F.; PINO, R. Trasmisión vertical de *Anaplasma marginale* en bovinos afectados durante el periodo final de la gestación. *Rev. Cub. Ci. Vet.*, v. 19, p. 179-181, 1988.
- SHKAP, V.; MOLAD, T.; FISH, L. et al. Detection of the *Anaplasma centrale* vaccines strain and specific differentiation from *Anaplasma marginale* in vaccinated and infected cattle. *Parasitol. Res.*, v. 88, p. 546-552, 2002a.
- SHKAP, V.; MOLAD, T.; BRAYTON, K.A. et al. Expression of major surface protein 2 variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma central* vaccinates. *Infect. Immun.*, v. 70, p. 642-648, 2002b.
- SILVEIRA, J.A.G. *Ocorrência de hemoparasitos e ectoparasitos em veado-catingueiro (Mazama gouazoubira Fischer, 1814), veado-campeiro (Ozotocerus bezoarticus Linnaeus, 1758) e cervo-do-pantanal (Blastocerus dichotomus Illiger, 1815): utilização de métodos parasitológicos e moleculares*. 2012. 133f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SILVEIRA, J.A.G.; RABELO, E.M.L.; RIBEIRO, M.F.B. Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer

- (*Blastocercus dichotomus*, Illiger, 1815). *Transbound. Emerg. Dis.*, v. 59, p. 353-360, 2012.
- SOUZA, J.C.P.; SOARES, C.O.; MASSARD, C.L. et al. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 20, p. 97-101, 2000.
- SOUZA, J.C.P.; SOARES, C.O.; MADRUGA, C.R. et al. Prevalência de anticorpos anti*Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do Médio Paraíba. *Ciência Rural*, v. 31, p. 309-314, 2001.
- SWIFT, B.L.; PAUMER, R.J. Vertical transmission of *Anaplasma marginale* in cattle. *Theriogenology*, v. 6, p. 515-519, 1976.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON N. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, v. 28, p. 2731-2739, 2011.
- VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M. Diagnóstico em anaplasmoze bovina. *Ciência Rural*, v. 31, p. 361-368, 2001.
- VISSER, E.; McGUIRE, T.; PALMER, G. et al. The *Anaplasma marginale msp5* gene encodes a 19-KD conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect. Immun.*, v. 60, p. 5139-5144, 1992.
- WAMSLEY, H.L.; ALLEMAN, A.R.; JOHNSON, C.M. et al. Investigation of endothelial cells as an *in vivo* nidus of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Vet. Microbiol.*, v. 153, p. 264-273, 2011.
- YOSHIHARA, E.; VIDOTTO, O.; YAMAMURA, M.H. et al. Studies of natural infection with *Anaplasma marginale* in Nelore cattle in the Umuarama municipality, Paraná state, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 12, p. 21-26, 2003.
- ZAUGG, J.L.; KUTTLER, K.L. Bovine anaplasmosis: in utero transmission and the immunologic significance of ingested colostral antibodies. *Am. J. Vet. Res.*, v. 45, p. 440-443, 1984.
- ZAUGG, J.L. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *Am. J. Vet. Res.*, v. 46, p. 570-572, 1985.

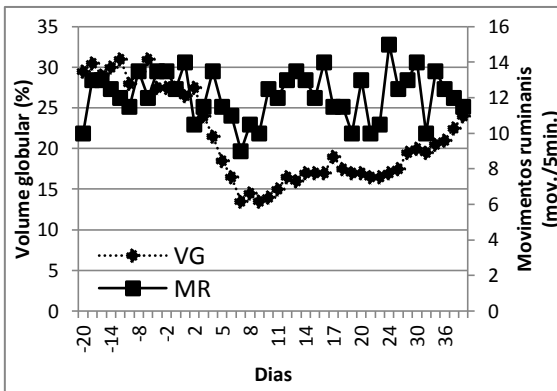
ANEXOS



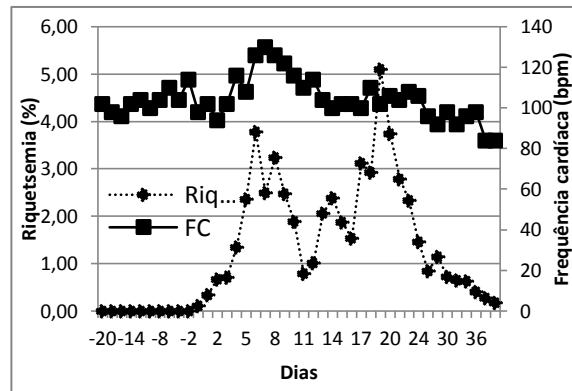
Anexo 1. Dinâmica das medianas do volume globular e temperatura retal de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.



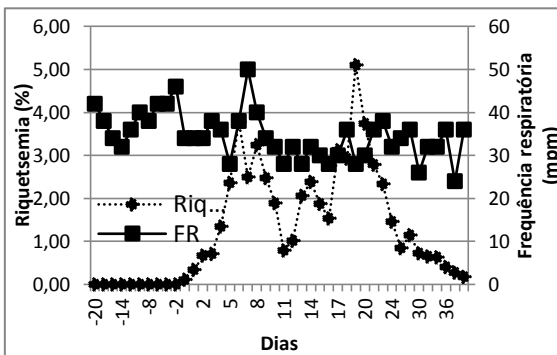
Anexo 2. Dinâmica das medianas do volume globular e frequência respiratória de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.



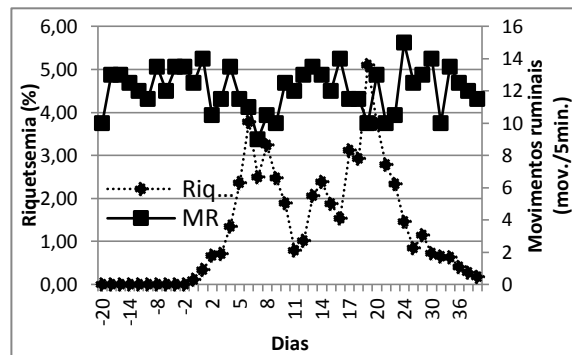
Anexo 3. Dinâmica das medianas do volume globular e movimentos ruminiais de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.



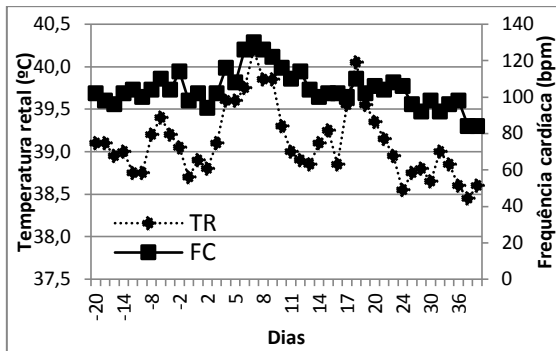
Anexo 4. Dinâmica das medianas da riquetsemia e frequência cardíaca de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.



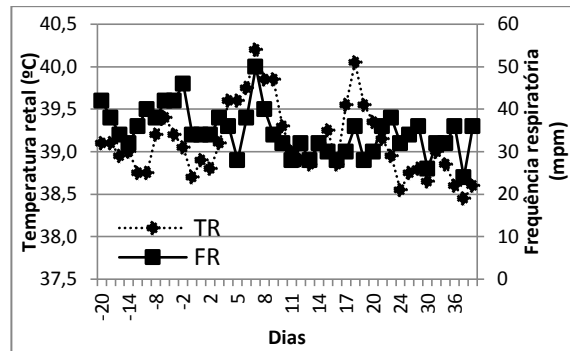
Anexo 5. Dinâmica das medianas da riquetsemia e frequência respiratória de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.



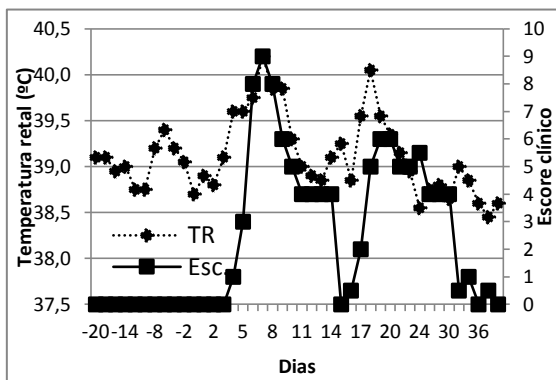
Anexo 6. Dinâmica das medianas da riquetsemia e movimentos ruminiais de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.



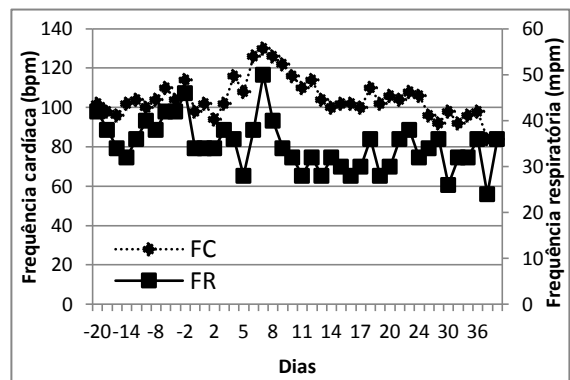
Anexo 7. Dinâmica das medianas da temperatura retal e frequência cardíaca de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.



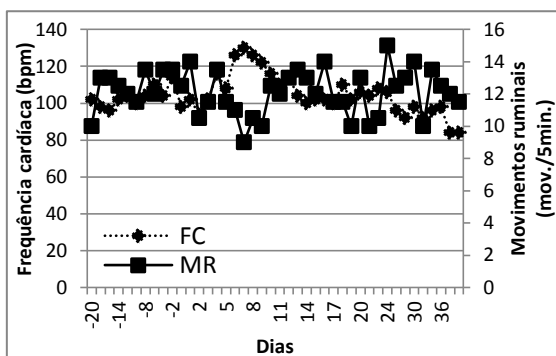
Anexo 8. Dinâmica das medianas da temperatura retal e frequência respiratória de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.



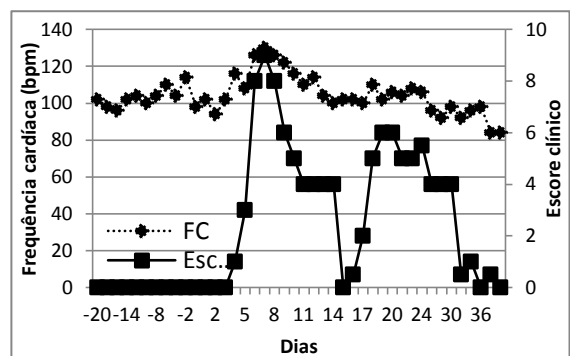
Anexo 9. Dinâmica das medianas da temperatura retal e escore clínico de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.



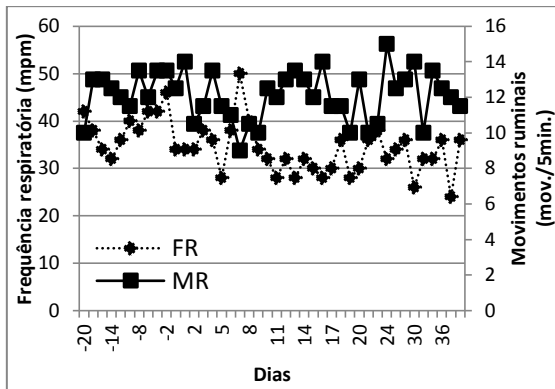
Anexo 10. Dinâmica das medianas das frequências cardíaca e respiratória de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.



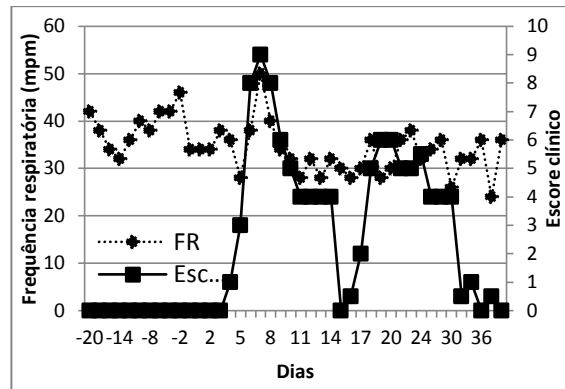
Anexo 11. Dinâmica das medianas da frequência cardíaca e movimentos ruminais de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.



Anexo 12. Dinâmica das medianas da frequência cardíaca e escore clínico de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.



Anexo 13. Dinâmica das medianas da frequência respiratória e movimentos ruminais de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.



Anexo 14. Dinâmica das medianas da frequência respiratória e escore clínico de bezerros inoculados com o isolado UFMG3 de *Anaplasma marginale*.