

Leonardo Costa Tavares Coelho

Anaplasmosse bovina: parâmetros clínicos e de patologia clínica em bezerros infectados experimentalmente

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

Área de Concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Antônio Último de Carvalho

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2007

C672a *Coelho, Leonardo Costa Tavares, 1978-*

Anaplasmosse bovina: parâmetros clínicos e de patologia clínica em bezerros infectados experimentalmente / Leonardo Costa Tavares Coelho. – 2007.
65 p. : il.

Orientador: Antônio Último de Carvalho
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Bezerro – Doenças – Teses. 3. Anaplasmosse – Teses.
I. Carvalho, Antônio Último de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.208 969

Tese defendida em 09 de março de 2007 e aprovada pela Comissão Examinadora composta por:

Prof. Antônio Último de Carvalho
(Orientador)

Prof. Elias Jorge Facury Filho

Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

Prof^a. Adriana de Souza Coutinho

Dedico aos animais, mais nobres habitantes deste planeta e razão deste trabalho, e a meus pais Ricardo e Beatriz pelo eterno incentivo.

“...Viver e a nossa alegria
Seguir é a nossa missão
E tudo se resume
Em estar aqui num dia
Noutro dia não...”

Hora do Clarão – Almir Sater

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me mandar pra este mundo e a meus pais por me ensinarem o valor do estudo e do trabalho.

Aos Grão-Mestres, Profs. Elias e Último em primeiro lugar pela amizade, confiança, paciência (inesgotável), pelos inestimáveis ensinamentos sobre os fantásticos ruminantes e seu funcionamento e pelo exemplo de postura ética e profissional.

Aos Professores Paulo Marcos, Marília, Lívio, Monteiro, Valentim, Sandra, Fabiene e Állan pelos exemplos de conduta profissional e por compartilharem suas experiências profissionais e disponibilizarem seus conhecimentos com amor.

Aos Professores Múcio e à Camila pelo apoio, amizade, confiança e por viabilizarem a realização do experimento.

Ao Professor Paulo Ricardo pela amizade e apoio incondicionais e pela disponibilização dos exames laboratoriais.

À Professora Maristela Palhares pela confiança, pelo exemplo de seriedade e sem a qual a realização deste trabalho não seria possível.

Ao Professor Marcos, grande estatístico e futuro violeiro, pela gentileza na orientação das análises estatísticas.

Aos funcionários da Escola de Veterinária da UFMG Dário, Adão, Pedro, Aílton, Carlos, Tião, Regina, Joelma, Marcinha, Palhinha, Liu, Nilda, Ana Maria, Maricélia e Fabinho pelo carinho, amizade e apoio eterno em todas atividades.

Aos eternos amigos, sem os quais não seria possível a vida na Terra: Rafa, Márcio, Débora, Fernando, Ângelo, Bel, Marina, Lu, Moisés, Jair, Aníbal, Alemão, Aninha, Nersão, Enxurrada, Juliano, Luciano, Carlos Pelegrino, Fujão, Divino, Pagode, João M., Fontes, Goiás, Matheus, Helen, Déia, Luciana, Mala, Serginho, Marcinho, Neto, Marine, Linguagem, Mary's, Danilo, Dani, DeBiolas, Paraíba, Chico Estrela, Flávio Costa, Raul Moraes, Luiza, Teca, Tonim, Lucas Carol, Mamão e aos adoráveis esquecidos.

Aos irmãos do Trio Viola, Mutum e Canjão, pelos impagáveis momentos de alegria, por fazerem as pessoas mais felizes com seu canto e pela grande amizade cultivada.

Aos bezerros que participaram involuntariamente da realização deste trabalho, sem reclamar.

Aos fiéis estagiários que sofreram a cada agulhada e garantiram o bem estar e comodidade dos animais, com muita boa vontade, disposição e carinho, auxiliando com eficiência a realização deste trabalho.

À Biobrás Diagnósticos por ceder as fitas de urinálise.

Sumário

<i>Lista de Anexos</i>	09
<i>Lista de Tabelas</i>	7
<i>Lista de Abreviaturas</i>	11
<i>Resumo</i>	12
<i>Abstract</i>	13
1. <i>Introdução</i>	14
2. <i>Revisão de Literatura</i>	14
2.1. <i>Anaplasnose</i>	14
2.2. <i>Parâmetros Hematológicos</i>	17
2.2.1. <i>Hematócrito (Ht)</i>	18
2.2.2. <i>Hemoglobina (Hb)</i>	18
<i>Tabela 1 – Relação entre o hematócrito e as proteínas plasmáticas</i>	19
2.2.3. <i>Índices Hematimétricos: Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Celular Média (CHCM) e Distribuição Espacial dos Eritrócitos (RDWc)</i> ..	19
2.2.4. <i>Alterações morfológicas</i>	20
2.2.5. <i>Anemias</i>	20
2.2.5.1. <i>Anemia na Anaplasnose</i>	21
2.2.6. <i>Leucograma</i>	22
2.3. <i>Homeostase</i>	22
2.3.1. <i>Sódio (Na⁺)</i>	22
2.3.2. <i>Potássio (K⁺)</i>	23
2.3.3. <i>Cloro (Cl)</i>	24
2.4. <i>Equilíbrio Ácido-Básico</i>	24
2.4.1. <i>pH</i>	25
2.4.2. <i>Bicarbonato (HCO₃⁻)</i>	25
2.4.3. <i>Pressão Parcial de Dióxido de Carbono (pCO₂)</i>	25
2.4.4. <i>Dióxido de carbono Total (tCO₂)</i>	25
2.4.5. <i>Excesso de Bases (BE)</i>	25
2.4.6. <i>Diferença Aniônica (Anion Gap - AG)</i>	26
2.5. <i>Parâmetros Bioquímicos</i>	26
2.5.1. <i>Uréia Nitrogenada (BUN)</i>	26
2.5.2. <i>Glicose</i>	26
2.5.3. <i>Proteínas Totais</i>	26
2.6. <i>Urinálise</i>	26
2.6.1. <i>Densidade específica (DE)</i>	27
2.6.2. <i>pH</i>	27
2.6.3. <i>Proteínas</i>	27
2.6.4. <i>Glicose</i>	27
2.6.5. <i>Corpos Cetônicos</i>	27
2.6.6. <i>Bilirrubina</i>	27
2.6.7. <i>Sangue Oculto</i>	27
3. <i>Material e Métodos</i>	28
3.1. <i>Local e período</i>	28
3.2. <i>Animais</i>	28
3.3. <i>Experimentos</i>	28
3.3.1. <i>Experimento I</i>	28
3.3.2. <i>Experimento II</i>	29
3.4. <i>Inóculos</i>	29
3.4.1. <i>Amostra com apêndice</i>	29
3.4.2. <i>Amostra sem apêndice</i>	29
3.5. <i>Coleta de Dados</i>	29
3.5.1. <i>Exames Físicos</i>	29
3.5.2. <i>Coleta de Material</i>	30

3.5.3.	Análises Laboratoriais.....	31
3.6.	Análises Estatísticas.....	31
4.	Resultados e Discussão.....	31
4.1.	Experimento I.....	31
4.1.1.	Hematócrito e Parasitemia	31
4.1.2.	Exames Físicos.....	34
4.2.	Experimento II.....	38
4.2.1.	Hematócrito e Parasitemia	38
4.2.2.	Exames Físicos.....	39
4.2.3.	Equilíbrio Eletrolítico.....	43
4.2.4.	Equilíbrio Ácido-Básico.....	45
4.2.5.	Hemogramas	49
4.2.6.	Parâmetros Bioquímicos.....	51
4.2.7.	Urinálise.....	52
4.2.8.	Achados de necropsia.....	55
5.	Considerações Finais.....	55
6.	Conclusões.....	57
7.	Referências Bibliográficas.....	58

Lista de Anexos

Anexos.....	61
Anexo 1 – Análise de correlação entre hematócrito, parasitemia e escore de coloração mucosas, durante o Experimento I.....	61
Anexo 2 – Análise de correlação entre hematócrito, temperatura, frequência respiratória e pontuação de exame do sistema respiratório, durante o Experimento I.....	61
Anexo 3 – Análise de correlação entre hematócrito e os parâmetros fisiológicos, durante o Experimento I.....	61
Anexo 4 – Análise de correlação entre hematócrito, parâmetros fisiológicos e escore de hidratação, durante o Experimento I.....	61
Anexo 5 – Análise de correlação entre hematócrito, parâmetros fisiológicos e escore de comportamento, durante o Experimento I.....	61
Anexo 6 – Análise de correlação entre hematócrito, parâmetros fisiológicos e escores de exames clínicos, durante o Experimento I.....	61
Anexo 7 – Análise de correlação entre hematócrito, parasitemia e escore de coloração de mucosas, durante o Experimento II.....	62
Anexo 8 – Análise de correlação entre hematócrito, parasitemia e temperatura retal, durante o Experimento II.....	62
Anexo 9 – Análise de correlação entre hematócrito, parasitemia e parâmetros fisiológicos, durante o Experimento II.....	62
Anexo 10 – Análise de correlação entre hematócrito, parâmetros fisiológicos e escore de exame clínico do sistema respiratório durante o Experimento II.....	62
Anexo 11 – Análise de correlação entre hematócrito, parâmetros fisiológicos e escore de exame clínico de comportamento, durante o Experimento II.....	62
Anexo 12 – Análise de correlação entre hematócrito, parâmetros fisiológicos e escore de hidratação, durante o Experimento II.....	62
Anexo 13 – Análise de correlação entre hematócrito, parâmetros fisiológicos e escore de exame clínico geral, durante o Experimento II.....	63
Anexo 14 – Análise de correlação entre hematócrito, parasitemia e escores de exame clínico, durante o Experimento II.....	63
Anexo 15 – Análise de correlação entre hematócrito, parasitemia, T°C, FC e FR, durante o Experimento II.....	63
Anexo 16 – Análise de correlação entre hematócrito e a concentração sérica de hemoglobina, durante o Experimento II.....	63
Anexo 17 – Análise de correlação entre o hematócrito, e as concentrações séricas de Na, Cl e K, durante o Experimento II.....	63
Anexo 18 – Análise de correlação entre o hematócrito, a pCO ₂ , pCO ₂ , o pH e as concentrações séricas de HCO ₃ , durante o Experimento II.....	63
Anexo 19 – Análise de correlação entre o hematócrito, excesso de bases e ânion gap, durante o Experimento II.....	644
Anexo 20 – Análise de correlação entre o hematócrito, e as concentrações séricas de glicose e uréia, durante o Experimento II.....	644

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1 – Relação entre o hematócrito e as proteínas plasmáticas.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 2- Escore de Exame Clínico.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 3 – Interpretação da pontuação de escore de exame físico (EEC).....</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 4 – Cálculo das concentrações séricas de Na⁺, Cl⁻ e HCO₃⁻ a partir do valor do hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de A. marginale sem apêndice, em bezerros HPB (n=5),, com 90 a 110 dias de idade. Belo horizonte, 2006.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 5 – Valores médios e desvios padrão das concentrações de Na⁺, Cl⁻, K⁺, HCO₃⁻ e do pH, pCO₂ e tCO₂ na fase de patência da anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de A. marginale sem apêndice, em bezerros HPB, com 90 a 110 dias de idade.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabela 6 – Valores médios e desvios padrão das concentrações de BUN, hemoglobina e glicose e dos valores do hematócrito, BE e AG na fase de patência da anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de A. marginale sem apêndice, em bezerros HPB, com 90 a 110 dias de idade.....</i>	<i>65</i>

Lista de Abreviaturas

NH ₄	Amônia
AG	Diferença Aniônica
BE	Excesso de Bases
BUN	Uréia Nitrogenada
CHCM	Concentração de Hemoglobina Celular Média
Cl ⁻	Cloro
Co	Cobalto
CO ₂	Dióxido de Carbono
Cu	Cobre
DE	Densidade Específica da urina
dL	Decilitros
EEF comp	Escore de Exame Físico do Comportamento
EEF geral	Escore de Exame Físico Geral
EEF hidr	Escore de Exame Físico do Grau de Hidratação
EEF muc	Escore de Exame Físico das Mucosas
EEF resp	Escore de Exame Físico do Sistema Respiratório
FC	Frequência Cardíaca
Fe	Ferro
FR	Frequência Respiratória
g	Gramas
H ⁺	Hidrogênio
H ₂ CO ₃	Ácido Carbônico
H ₂ O	Água
Hb	Hemoglobina
HCO ₃ ⁻	Íon Carbonato (Bicarbonato)
HPB	Holandês Preto e Branco (Raça)
Ht%	Hematócrito
K ⁺	Potássio
L	Litro
LEC	Líquido Extracelular
LIC	Líquido Intracelular
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mmol	Milimoles
MSP's	Proteínas Principais de Superfície
Na ⁺	Sódio
NH ₃	Uréia
O ₂	Oxigênio
pCO ₂	Pressão Parcial de Dióxido de Carbono
RDWc	Distribuição Espacial das Células Vermelhas
SMF	Sistema Monocítico Fagocitário
SNC	Sistema Nervoso Central
tCO ₂	Dióxido de Carbono Total
TPB	Tristeza Parasitária Bovina
TR	Temperatura Retal
VCM	Volume Celular Médio

Resumo

Foram realizados dois experimentos para avaliar o comportamento clínico e alterações de patologia clínica da anaplasose induzida experimentalmente por duas cepas diferentes de *A. marginale*. No Experimento I, seis bezerros HPB, com idade entre 30 e 40 dias, foram inoculados com uma cepa de *A. marginale* com apêndice. No Experimento II, cinco bezerros HPB, com idade entre 90 e 110 dias, foram inoculados com uma cepa de *A. marginale* sem apêndice. No Experimento II foram avaliadas as alterações nos parâmetros hematológicos, bioquímicos, perfil eletrolítico e o equilíbrio ácido-básico. No Experimento I, os animais apresentaram quedas de mais de 50% do hematócrito e sinais clínicos brandos da doença. O período convalescente foi de 30 dias e, após cerca de 70 dias, foi observada uma recidiva da infecção, com aumento discreto da parasitemia, atingindo em torno de 1%. Neste momento, não foram observadas redução do hematócrito nem a manifestação de sinais clínicos. No Experimento II, os animais apresentaram quedas de mais de 50% do hematócrito e sinais clínicos intensos da doença, incluindo apatia, redução do apetite, hipertermia, mucosas pálidas ou ictéricas, taquipnéia e taquicardia. Durante o período patente da anaplasose os animais apresentaram desidratação moderada com diminuição de Na^+ , Cl^- e HCO_3^- , acidose metabólica compensada, hipoglicemia, aumento de uréia nitrogenada sanguínea. A urina apresentou-se ácida, com aumento da excreção de bilirrubina e urobilinogênio. As alterações nos parâmetros hematológicos indicaram a ocorrência de uma anemia inicialmente normocítica e normocrômica, evoluindo para macrocítica e normocrômica, além de leucocitose com aumento nas contagens de linfócitos e neutrófilos. Foi observada a existência de uma correlação positiva entre os valores do hematócrito e as concentrações de Na^+ ($r^2=0,7767$), Cl^- ($r^2=0,6778$) e HCO_3^- ($r^2=0,7003$), permitindo a realização de um cálculo para estipular o déficit destes íons, a partir do valor do hematócrito. A anemia causada pela anaplasose é responsável por alterações do equilíbrio eletrolítico e ácido-básico que demandam ativação dos mecanismos de compensação, alterando parâmetros fisiológicos para manutenção da vida do animal. O conhecimento dessas alterações pode permitir a elaboração de tratamentos de suporte mais adequados visando aumentar o sucesso da terapia da anaplasose.

Palavras Chave: Anaplasose; Equilíbrio ácido-básico; Anemia; Doenças de bezerro; Tristeza Parasitária.

Abstract

Two studies were done to evaluate the clinical and clinic-pathological findings of experimentally induced bovine anaplasmosis, using two different strains of *A. marginale*. The first used six 30 to 40 days old Holstein calves inoculated with a *A. marginale* strain with an inclusion appendage and the second one with five 110 to 120 days old calves, inoculated with a *A. marginale* strain without inclusion appendage. The Experiment II evaluated the hematological and biochemical parameters, electrolytic profile and acid-base balance of infected animals. Animals of the Experiment I presented a drop of more than 50% on the package cell volume (PCV) and mild clinical signs during the patent period of the disease. The convalescent period was 30 days long and until 70 days after the peak of anemia animals presented mild cyclic elevations in the ricketsemia, but without clinical signs neither reduction in the PCV, characterizing the carrier stage. The animals of Experiment II presented high drops in PCV values (below 50%) and more severe clinical signs, including depression, loss of appetite, hyperthermia, pale or icteric mucous membranes, increase heart and respiratory rates and moderate dehydration. Decreased concentrations of Na^+ , Cl^- e HCO_3^- , metabolic acidosis, hypoglycemia and an increase in levels of blood urea nitrogen have been observed. Urine sample analysis demonstrated to be acid with higher values of bilirubin and urobilinogen. The hematological findings were indicative of anemia changing from normocytic, normochromic at the beginning to macrocytic, normochromic. Leukocytosis was often detected with high values of lymphocytes and neutrophils. It was noticed the existence of a negative correlation between the PCV values and the Na^+ , Cl^- and HCO_3^- concentrations, leading to the development of an equation, by a linear regression analysis, to predict the concentrations of Na^+ ($r^2=0,7767$), Cl^- ($r^2=0,6778$) e HCO_3^- ($r^2=0,7003$), using the PCV values, that could be used for the development of new treatment strategies. Anaplasmosis anemia is implicated to modify blood electrolyte profiles and acid-base balance, which requires the activation of mechanisms of protection for body to compensate the variations of clinical signs, to maintain the life of sick animals. Knowledge of disease and the study of disturbances caused by it allow the development of treatment strategies pointing to the correction of this alterations to support the success of anaplasmosis control.

Keywords: Anaplasmosis; acid-base balance; anemia; calves diseases; Tick fever;

1. Introdução

A anaplasmosose é uma doença causada por uma bactéria da ordem das Riquetsias e da espécie *Anaplasma spp.*, cuja principal representante, a *A. marginale* que, juntamente com a babesiose forma um complexo de doenças hemolíticas, denominado Tristeza Parasitária Bovina que é responsável por prejuízos significativos na pecuária mundial. Estima-se que na América Latina as perdas econômicas causadas anualmente pela doença sejam da ordem de US\$ 800 a 875 milhões (Kocan *et al.*, 2003).

Na maior parte do Brasil, onde a população de vetores está presente durante o ano inteiro, os animais são relativamente resistentes à doença, desenvolvendo imunidade nos primeiros meses de vida, devido à infecção precoce pelo *A. marginale*, quando ainda estão protegidos pelos anticorpos colostrais. Nestas regiões, surtos e altas taxas de mortalidade são raros, criando uma condição de estabilidade enzoótica (Souza *et al.*, 2000). Porém, vários levantamentos epidemiológicos realizados no Brasil têm observado a ocorrência de surtos e casos clínicos de anaplasmosose, caracterizando a ocorrência de áreas epizooticas (Ribeiro e Reis, 1981b; Araújo *et al.*, 1998).

Os animais acometidos pela forma aguda apresentam febre, anorexia, apatia e anemia severa. O grau de anemia parece estar diretamente relacionado à mortalidade na doença, porém os mecanismos que os conectam não estão bem esclarecidos e a elaboração de um prognóstico com base nestas alterações é difícil (Allen e Kuttler, 1981).

As alterações decorridas da destruição maciça de hemácias, com a redução da capacidade de transporte de O₂ e CO₂ levando à hipóxia tecidual, e a liberação de produtos originados da sua lise provocam alterações no equilíbrio eletrolítico e ácido-básico. A diferença entre a vida e a morte está na capacidade de regulação do pH sanguíneo dos animais acometidos (Allen e Kutler, 1981).

O conhecimento das alterações eletrolíticas e ácido-básicas durante a fase de patência, quando ocorrem as manifestações clínicas da doença, é de grande utilidade para a elaboração de um tratamento de suporte e para a determinação do prognóstico, reduzindo significativamente os prejuízos causados pela doença. Porém, estes exames normalmente só podem ser efetuados em laboratórios clínicos e levam alguns dias para serem realizados.

O objetivo geral foi avaliar as interações entre os parâmetros clínicos e de patologia clínica e suas conseqüências sobre os animais acometidos, visando à elaboração de futuras estratégias para tratamento e controle da doença.

Este trabalho teve como objetivos específicos:

Descrever a evolução clínica da anaplasmosose, induzida experimentalmente pela inoculação de uma cepa, de *A. marginale* com apêndice em bezerros Holandês Preto e Branco (HPB), com idade entre 30 e 40 dias;

Avaliar as alterações nos parâmetros clínicos e de patologia clínica, durante a fase de patência da anaplasmosose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB, com idade entre 110 e 120 dias;

2. Revisão de Literatura

2.1. Anaplasmosose

A doença é causada por uma bactéria intra-eritrocitária obrigatória, da ordem *Rickettsiales*, da família *Anaplasmataceae* e do gênero *Anaplasma*, sendo as principais espécies a *Anaplasma marginale* (mais patogênica) e *Anaplasma centrale* (Losos, 1986). A transmissão é feita por carrapatos, vetores biológicos (Connell, 1974), e por moscas e mosquitos hematófagos e material cirúrgico ou agulhas contaminadas, vetores mecânicos (Losos, 1986). Também há relatos da transmissão por via intra-uterina e transplacentária (Ribeiro *et al.*, 1995; Benesi *et al.*, 1999).

A doença é endêmica nas regiões tropicais e subtropicais, estando intimamente relacionada com a distribuição geográfica do carrapato *Boophilus microplus* (Losos, 1986; Wanduragala e Ristic, 1993). No Brasil, a inter-relação entre o carrapato e a tristeza parasitária bovina gera duas situações epidemiológicas diferentes, que devem ser consideradas:

A primeira situação é observada nas regiões onde há uma flutuação periódica na população de vetores, que pode ser devida às condições climáticas ou pode ser provocada por estratégias inadequadas no controle de ectoparasitas. Nestas condições, quando os animais estão por um longo período sem contato com o agente e se infectam com o *Anaplasma marginale*, apresentam uma sintomatologia clínica aguda, com altas taxas de mortalidade. Nestes casos, a situação é denominada de instabilidade enzoótica (Ribeiro *et al.*, 1984; Oliveira *et al.*, 1992; Nascimento *et al.*, 2006).

A segunda situação ocorre nas áreas endêmicas, onde população de vetores está presente durante o ano todo. Nestas regiões, os animais apresentam maior resistência à infecção, pois desenvolvem imunidade nos primeiros meses de vida, ao serem infectados pelo *Anaplasma* quando ainda estão protegidos pelos anticorpos colostrais, e passam a ser portadores. Esta situação caracteriza áreas de estabilidade enzoótica, onde não são esperados surtos, nem altas taxas de mortalidade (Ribeiro e Reis, 1981a; Souza *et al.*, 2000).

A evolução da doença pode ser dividida em quatro estágios: período de incubação, fase de desenvolvimento ou de patência, período convalescente e fase de portador (Richey, 1993).

O período de incubação varia entre 20 a 40 dias. Neste período, as formas infectantes do *A. marginale*, denominados corpúsculos iniciais, invadem as células epiteliais e em seguida hemácias, por um processo denominado rofecitose, formando vacúolos parasitóforos na margem das células. Neste estágio, multiplicam-se por

divisão binária, originando entre quatro a oito corpúsculos de inclusão, que podem ser liberados por um processo de rofecitose reversa ou transmitidos por meio de pontes entre as células, sem provocar o rompimento das membranas, iniciando um novo ciclo (Losos, 1986; Wanduragala e Ristic, 1993).

Na fase de patência, o principal sintoma da anaplasmose é a anemia, acompanhada de apatia, anorexia, mucosas pálidas ou ictéricas, hipertermia, dispnéia, taquicardia, fadiga, sialorréia, diarreia e poliúria, podendo levar à morte. A doença pode apresentar-se na forma aguda, subaguda ou crônica. Altos níveis de parasitemia são observados durante a fase de patência e, posteriormente, diminuem após o desenvolvimento da imunidade. Os sintomas são mais brandos nos animais jovens e mais acentuados nos adultos que apresentam maiores índices de mortalidade. (Losos, 1986; Wanduragala e Ristic, 1993; Radostitts *et al.*, 2002). O hematócrito pode cair para até 7%, tornando o prognóstico desfavorável. No entanto, com um hematócrito de 11% e com evidências de regressão da anemia, o prognóstico é bom, se o animal for tratado e mantido em repouso (Jain, 1986). Os principais achados de necropsia são carcaça e mucosas pálidas ou ictéricas, esplenomegalia, fígado friável e vesícula biliar distendida (Richey, 1993; Radostitts *et al.*, 2002).

O período convalescente é de cerca de um a dois meses, mas, comumente pode durar três meses ou mais. Após este período, o animal se torna portador e baixos níveis de infecção podem ser observados durante meses ou anos. Os animais portadores podem eliminar o parasito do seu organismo ou manifestar novamente a doença, em caso de queda na imunidade (Wanduragala e Ristic, 1993). A ocorrência de variações antigênicas, durante os ciclos intracelulares do parasito, resulta em infecção persistente, caracterizada por ciclos seqüenciais de aumento da riquetsemia, com intervalos de aproximadamente cinco semanas, mas atingindo níveis de parasitemia mais baixos do que os alcançados no primeiro pico, sendo rapidamente controlados pelo

desenvolvimento de uma resposta imune específica. A manutenção da condição de portador depende diretamente do mecanismo de fagocitose das células parasitadas, durante os episódios de aumento da riquetsemia que caracterizam esta fase da doença (Kieser *et al.*, 1990).

Trabalhos realizados em diversos países têm demonstrado a existência de formas morfológicamente diferentes de *A. marginale*, uma sem e outra com apêndice, que apresentam grande variedade antigênica nas diferentes regiões geográficas do mundo, devido a diferenças biológicas, na composição antigênica, na virulência e na capacidade de gerar proteção contra cepas homólogas ou heterólogas. A diferenciação dessas amostras tem sido realizada com base na sua transmissibilidade por carrapatos (Wickwire *et al.*, 1987), morfologia (Kocan *et al.*, 1984), perfil protéico pela análise de fragmentos de DNA (Fuente *et al.*, 2003) e reatividade a anticorpos monoclonais (Waghela *et al.*, 2000).

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

Os antígenos solúveis são glico ou lipoproteínas originadas a partir do metabolismo bacteriano. Estas proteínas são encontradas no plasma e no interior das células parasitadas, durante a fase aguda da doença, atingindo seu pico entre um e dois dias antes do pico de parasitemia. Porém, estes antígenos não promovem o desenvolvimento de imunidade e aparentam estar relacionados à patogenia da anemia auto-imune (Losos, 1986).

Os antígenos corpusculares são proteínas específicas presentes na superfície da *A. marginale* (proteínas principais de superfície – PPS's) que 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. Estes anticorpos funcionam como opsoninas, facilitando a fagocitose e a destruição dos microorganismos pelos macrófagos e também bloqueiam a invasão de novas hemácias, impedindo a aglutinação das células pelos corpúsculos iniciais (Buening, 1973; Grafias *et al.*, 2003).

Foram identificados seis tipos de MSP's (MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5) em microorganismos da espécie *A. marginale*. Essas proteínas podem ser sintetizadas a partir de um único gene (MSP1a, MSP4 e MSP5) ou de um grupo de genes (MSP1b, MSP2, MSP3). A MSP1a e a MSP1b são adesinas, responsáveis pela adesão do microorganismo aos eritrócitos e às células intestinais e das glândulas salivares dos carrapatos (MSP1a). A MSP1a apresenta grande variação entre os diferentes isolados, podendo ser utilizada para diferenciação entre as amostras. As MSP2 e MSP3 parecem estar ligadas à indução de uma resposta protetora contra o *A. marginale* e também apresentam variações antigênicas entre os isolados das diferentes regiões geográficas. As funções da MSP4 e MSP5 ainda são desconhecidas. A MSP5 induz a produção de anticorpos específicos, que podem ser detectados por exames sorológicos, tendo utilidade diagnóstica (Kocan *et al.*, 2003). A ocorrência de variações antigênicas destas proteínas durante a fase crônica da anaplasiose é um mecanismo de evasão da resposta imune e pode estar associado às flutuações na riquetsemia durante o período de portador, à manutenção da imunidade e ao desenvolvimento de proteção contra cepas heterólogas (Kieser *et al.*, 1990).

A resposta celular é mediada, principalmente, por Linfócitos T auxiliares (CD4+), que produzem a citocina interferon- γ (INF- γ). Essa citocina é responsável pela ativação de macrófagos e também estimula a produção da IgG2 pelos Linfócitos B (Buening, 1973; Grafias *et al.*, 2003; Kocan *et al.*, 2003).

Embora os mecanismos da anemia ainda não estejam completamente elucidados, há evidências de que a *A. marginale* provoca alterações na membrana celular dos eritrócitos parasitados. Estas alterações induzem à produção de anticorpos contra estas células e também contra os eritrócitos não parasitados, que são retirados da corrente sanguínea pelas células do Sistema Monocítico Fagocitário (SMF). Giardina *et al.* (1993) e Meléndez (2005), observaram, em testes *in vitro*, a fagocitose de eritrócitos parasitados e não parasitados de animais inoculados com *A. marginale* e também de hemácias de animais saudáveis, que nunca tiveram contato com o agente, após a adição de soro de um animal portador na cultura celular.

O diagnóstico da anaplasmosose é realizado através da análise dos sinais clínicos e confirmado pela visualização do parasito no interior das hemácias do sangue periférico, no exame de esfregaço sanguíneo (Losos, 1986; Radostitts *et al.*, 2002; Thrall, 2004). Também podem ser realizadas provas sorológicas diretas e indiretas como os testes de ELISA (Braz *et al.*, 1995), RIFI (Vieira *et al.*, 2002) e de aglutinação em gel (Ameralut e Roby, 1968), para detecção de anticorpos contra o microorganismo indicadas, principalmente, nas fases de baixa parasitemia.

2.2. Parâmetros Hematológicos

A produção dos eritrócitos é regulada pela eritropoietina, hormônio secretado pelos rins. Se houver suprimento adequado de proteínas, minerais e vitaminas, a medula óssea pode aumentar seu ritmo de produção de seis a oito vezes, em 48 a 78 horas, sob o estímulo deste hormônio. No entanto, em casos de deficiência de algum desses nutrientes, ocorre redução da eritrogênese (Jain, 1986; Meyer *et al.*, 1995).

A produção das células vermelhas do sangue ocorre principalmente na medula óssea e, em menor escala, no baço e no fígado. Os eritrócitos são produzidos continuamente a partir de células-tronco multipotenciais com capacidade de auto-renovação, que se diferenciam para formar as células precursoras das linhagens

linfóide e mielóide. As células da linhagem mielóide se diferenciam novamente, dando origem aos grupos de células especializadas que produzirão os eritrócitos, plaquetas, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos (Williams *et al.*, 1972; Meyer *et al.*, 1995).

As células precursoras dos eritrócitos são nucleadas e se dividem por mitose, sob o estímulo da eritropoietina, passando por um processo de diferenciação, a cada divisão, até originar um novo eritrócito, que é liberado na corrente sanguínea. Elas se organizam em colônias formadas por uma ou duas células-tronco, circundadas pelas demais células da linhagem eritroblástica em diferentes estágios de desenvolvimento (Williams *et al.*, 1972; Meyer *et al.*, 1995).

As primeiras células especializadas na produção das hemácias são os prorrubrícitos, programados exclusivamente para produção, empacotamento e proteção das moléculas de hemoglobina. São células grandes com um núcleo altamente ativo e no citoplasma, repleto de mitocôndrias e ribossomos, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático liso e rugoso apresentam sinais de intensa atividade. A hemoglobina é sintetizada no núcleo e, posteriormente, lançada no citoplasma na forma de grânulos de ferritina ou hemossiderina (Williams *et al.*, 1972; Meyer *et al.*, 1995).

As sucessivas divisões e as alterações morfológicas dos prorrubrícitos até a formação do eritrócito compreendem uma série de eventos programados. Inicialmente, nota-se uma intensa atividade metabólica celular e a produção de hemoglobina, que vão sendo gradualmente reduzidas após cada divisão e diferenciação em uma nova célula da linhagem eritróide. Os prorrubrícitos dão origem aos rubrícitos basofílicos e estes originam os rubrícitos normocrômicos. Os rubrícitos normocrômicos são as últimas células da linhagem eritróide que realizam mitose, formando os metarrubrícitos, que, após um período de maturação, saem da matriz óssea para os capilares da medula óssea por um processo de diapedese, perdendo seus núcleos e originando os reticulócitos. Após

a perda do núcleo, as atividades metabólicas diminuem e as organelas desaparecem gradualmente. Em cerca de 48 horas, o período de maturação dos reticulócitos está terminado e os novos eritrócitos são lançados na circulação (Williams *et al.*, 1972; Meyer *et al.*, 1995).

Os eritrócitos senescentes são destruídos continuamente pelos macrófagos do SMF. Após a remoção dos eritrócitos do sangue, a hemoglobina é metabolizada liberando o Fé, que é estocado temporariamente, na forma de um composto denominado ferritina, para ser reutilizado. A globina vai para um reservatório de aminoácidos e a bilirrubina é excretada pelo fígado (Meyer *et al.*, 1995).

Os parâmetros avaliados para se determinar as alterações hematológicas e a eritropoiese são: o hematócrito (Ht - %); a contagem do número de células por μL de sangue; a concentração de hemoglobina (Hb - g/dL); o volume celular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina celular média (CHCM). Outras informações podem ser fornecidas pela avaliação das alterações morfológicas e da contagem de leucócitos e reticulócitos em esfregaço sanguíneo (Meyer *et al.*, 1995; Thrall, 2004).

Os parâmetros hematológicos dos bovinos estão sujeitos à variação devido a diferenças fisiológicas, dependendo da atividade muscular, hora do dia, temperatura ambiente, excitação, balanço hídrico, altitude, nutrição, idade e raça do animal (Meyer *et al.*, 1995).

2.2.1. Hematócrito (Ht)

O hematócrito deve ser a escolha clínica pragmática para uma análise inicial da situação, pois o número de hemácias e a concentração de hemoglobina geralmente se mantêm paralelas ao valor do hematócrito. O método mais comum para sua determinação é a centrifugação do microhematócrito e seu valor reflete o volume de células vermelhas no sangue, sendo um indicador chave do grau de hidratação ou de anemia e também refletindo a capacidade de transporte de O_2 . A desidratação é a principal causa de

aumento no valor do hematócrito e as anemias (hemolítica, hemorrágica, por depressão medular ou por deficiência de Fe) provocam redução do valor deste parâmetro (Jain, 1986; Thrall, 2004). Os valores normais de hematócrito variam entre 26 e 42% nos bovinos (Meyer *et al.*, 1995).

Uma informação complementar, que pode auxiliar na interpretação do hematócrito, pode ser obtida através da análise da relação entre seu valor com a concentração de proteínas plasmáticas, como exemplificado na Tabela I (Meyer *et al.*, 1995).

2.2.2. Hemoglobina (Hb)

Após a destruição das hemácias nas células do SMF a hemoglobina liberada é catabolizada em uma fração protéica (globina) e na fração heme. A globina se incorpora ao conjunto de proteínas plasmáticas e a fração heme é novamente catabolizada, até Fe^{+3} , que é retido pelo organismo para ser reutilizado, e em uma porfirina (hemobilirrubina), que é liberada na corrente sanguínea. Ao atingir o fígado, a hemobilirrubina é conjugada formando a colebilirrubina, que é excretada na bile e lançada no intestino, onde é convertida pela flora bacteriana em urobilinogênio. A maior parte do urobilinogênio é excretada nas fezes e uma pequena parte é reabsorvida e novamente excretada pelo fígado e pelos rins (Allbritton e Seger, 1962).

A determinação da concentração de hemoglobina pode ser afetada em casos de lipemia e na presença de corpúsculos de Heinz. A hemólise *in vivo* ou *in vitro* pode aumentar os valores da hemoglobina total de uma amostra e o valor da concentração de hemoglobina celular média (CHCM). Normalmente, o valor da hemoglobina é de um terço do hematócrito (Jain, 1986; Thrall, 2004). Os valores normais de hemoglobina variam entre 5 e 8,7 g/dL nos bovinos (Meyer *et al.*, 1995). Nos casos clínicos de anaplasiose, diversos autores relatam uma redução acentuada dos níveis de hemoglobina, abaixo de 3 g/dL, concomitante à redução do hematócrito (Allbritton e Seger, 1962).

Tabela 1 – Relação entre o hematócrito e as proteínas plasmáticas

Hematócrito	Proteínas Plasmáticas	Interpretações
Aumentado	Aumentado	Desidratação
	Normal	<ul style="list-style-type: none"> { Contração esplênica { Policitemia primária ou secundária { Desidratação com hipoproteïnemia
	Diminuído	Hipoproteïnemia com contração esplênica
	Aumentado	<ul style="list-style-type: none"> { Anemia mascarada por desidratação { Aumento de globulinas
Normal	Normal	Normal
	Diminuído	<ul style="list-style-type: none"> { Elevada perda de proteínas (rins ou trato gastrointestinal) { Diminuição da produção (distúrbio hepático)
	Aumentado	Anemia associada com desidratação
Diminuído	Normal	<ul style="list-style-type: none"> { Elevada destruição de hemácias { Diminuição da produção { Perda de sangue crônica (deficiência de Fe)
	Diminuído	<ul style="list-style-type: none"> { Super hidratação { Perda de sangue extrema

(Meyer, 1995)

2.2.3. Índices Hematimétricos: Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Celular Média (CHCM) e Distribuição Espacial dos Eritrócitos (RDWc)

O VCM se refere ao tamanho da célula que pode estar normal (normocítica), reduzida (microcítica) ou aumentado (macrocítica). A RDWc é um parâmetro que pode ser deduzido como uma representação numérica, altamente precisa de anisocitose eritrocitária, refletindo o grau variação no tamanho das células. O uso combinado da RDWc e do VCM pode ser útil na

classificação numérica das anemias, uma vez que estes valores estão relacionados (Jain, 1986; Meyer *et al.*, 1995; Thrall, 2004).

A CHCM é a concentração média de Hb num dado volume de hemácias. Os valores normais são determinados como normocrômicos e os reduzidos como hipocrômicos. Fisiologicamente, os eritrócitos não são produzidos com conteúdo maior de Hb, portanto este achado deve ser sempre considerado como artefato (Jain, 1986; Meyer *et al.*, 1995).

O VCM e CHCM são índices eritrocitários mais usados clinicamente, mas deve-se ressaltar que são sinais grosseiros das

alterações eritrocitárias e, em caso de anormalidade, é necessária uma investigação mais apurada (Meyer *et al.*, 1995).

A RDWc é uma reflexão da variação volumétrica dos eritrócitos, bem mais sensível que a inspeção visual desta alteração pelo esfregaço sangüíneo. Uma RDWc aumentada indica a presença de uma alteração nas subpopulações de eritrócitos maiores, menores ou uma combinação. Em caso de macrocitose, observa-se também um aumento no VCM, pois estes parâmetros estão diretamente relacionados, embora a RDWc possa apresentar alterações quando o VCM ainda é normal, uma vez que a RDWc é mais sensível às variações volumétricas das hemácias (Meyer *et al.*, 1995).

2.2.4. Alterações morfológicas

Através da leitura de um esfregaço sangüíneo, é possível analisar a morfologia dos eritrócitos. As alterações encontradas com maior frequência são anisocitose (variação no tamanho), poiquilocitose (variação no formato), alterações nas propriedades tintórias (policromasia e hipocromasia) e a presença de inclusões e agentes infecciosos nas hemácias (Meyer *et al.*, 1995; Thrall, 2004). A anisocitose ocorre comumente no sangue bovino normal, mas pode estar acentuada no caso de uma anemia macrocítica regenerativa, quando os reticulócitos são liberados da medula óssea para o sangue, aumentando o VCM ou no caso de uma anemia microcítica, secundária a uma deficiência de Fe⁺³, com redução do VCM (Jain, 1986; Meyer *et al.*, 1995). Os reticulócitos podem ser reconhecidos em esfregaços de sangue pelo seu tamanho maior e pela característica policromatófílica com corante de Romanowsky e, se presentes em número suficiente, o VCM estará aumentado, indicando macrocitose. A reticulocitose não é observada no sangue de bovinos saudáveis, mas a ocorrência da reticulocitose durante a anemia é um sinal positivo da recuperação da doença (Meyer *et al.*, 1995; Thrall, 2004).

2.2.5. Anemias

As anemias podem ocorrer devido à perda excessiva de sangue e por destruição ou redução da produção de eritrócitos, sendo classificadas em hemorrágica, hemolítica e por deficiência de produção. As anemias hemorrágicas podem ocorrer após procedimentos cirúrgicos cruentos prolongados, traumatismos, ruptura uterina pós-parto, etc. As principais causas de anemia hemolítica em bovinos são anaplasnose, babesiose, leptospirose, intoxicação crônica por Cu ou reação à transfusão sangüínea. As anemias por redução na produção de eritrócitos ou hemoglobina são causadas por deficiências de minerais (Fe, Co, Cu e K), por doenças supurativas crônicas, intoxicação por samambaia e parasitismo intestinal (Jain, 1986; Radostits *et al.*, 2002).

As alterações clínicas observadas durante as anemias estão em parte relacionadas à sua etiologia e patogênese. Nas anemias hemorrágicas agudas, por exemplo, ocorre redução do volume circulante e perda de proteínas plasmáticas. Nas anemias hemolíticas, em que ocorre destruição intravascular de eritrócitos, pode ocorrer necrose hemoglobinúrica, levando à depressão da função renal, podendo interferir na produção de eritropoietina (Radostits *et al.*, 2002; Thrall, 2004).

Os sinais clínicos das anemias não aparecem até que as concentrações sangüíneas de hemoglobina caiam abaixo de 50% do normal. Se a redução não for rápida, os animais podem suportar quedas de até 80% dos níveis normais de hemoglobina. Ocorre, paralelamente, redução da contagem de eritrócitos e do hematócrito. Nas anemias hemolíticas e hemorrágicas, observa-se aumento do número de reticulócitos no sangue. Na anemia hemorrágica, ocorre redução na concentração de proteínas totais, o que não é observado na anemia hemolítica (Meyer *et al.*, 1995; Radostits *et al.*, 2002).

Independente da causa, a primeira alteração funcional que ocorre nas anemias é a anóxia anêmica, que promove aumento na atividade eritropoiética estimulada pela

eritropoietina, que é secretada pelas células renais em resposta à hipóxia tecidual (Williams *et al.*, 1972; Radostits *et al.*, 2002; Thrall, 2004).

Alguns dos sintomas das anemias estão ligados à redução da capacidade de transporte de oxigênio, gerando hipóxia tecidual e ativando mecanismos compensatórios para bloquear ou atenuar as lesões causadas por esta alteração. Os principais mecanismos compensatórios das anemias, que podem ser observadas clinicamente são: aumento da perfusão tecidual nas regiões vitais, aumento do débito cardíaco e aumento da função pulmonar (Williams *et al.*, 1972).

O principal sinal clínico da anemia é a palidez das mucosas, mas podem ocorrer graus consideráveis de anemia, sem alterações clínicas visíveis na sua coloração. Outros sinais clínicos observados nas anemias são: fraqueza muscular e depressão. Podem ocorrer alterações nas bulhas cardíacas, como sopro, aumento da intensidade dos batimentos cardíacos em processos agudos e redução na fase terminal. A dispnéia não é acentuada, sendo mais evidente uma dificuldade respiratória causada por um aumento na profundidade da respiração (dispnéia mista), sem grande aumento na frequência. Nas fases terminais pode ocorrer respiração forçada (dispnéia inspiratória) (Radostits *et al.*, 2002; Thrall, 2004; Feitosa, 2004).

2.2.5.1. Anemia na Anaplasose

Na anaplasose, observa-se a ocorrência de uma anemia progressiva, devido à destruição extravascular dos eritrócitos no baço e na medula óssea. Inicialmente, a anemia é normocítica e mais tarde, evolui para macrocítica, com hiperplasia de medula óssea, reticulocitose, aumento do VCM (Thrall, 2004) e da fragilidade osmótica das hemácias (Baker *et al.*, 1960) e leucocitose, devido à linfocitose e neutrofilia. Os eritrócitos parasitados são removidos num período de poucos dias, reduzindo em até 80% o número de hemácias. Como há pouca hemólise intravascular, normalmente não se observa

hemoglobinemia ou hemogloninúria, mas pode ocorrer icterícia em alguns animais (Losos, 1986; Wanduragala e Ristic, 1993).

Com o aparecimento dos corpúsculos iniciais no sangue periférico, ocorre redução gradual do número de eritrócitos, conteúdo de hemoglobina e capacidade de oxigenação. As contagens de eritrócitos podem cair abaixo de dois milhões e a concentração de hemoglobina, abaixo de 3g/dL (Wanduragala e Ristic, 1993). Como ocorre redução das concentrações de fosfolipídeos na membrana das hemácias, acredita-se que este fato seja responsável pela redução da resistência osmótica dos eritrócitos, que demonstram maior fragilidade osmótica e mecânica (Baker *et al.*, 1960), juntamente com anisocitose, poiquilocitose e policromasia. A leucocitose normalmente é observada com contagens podendo ultrapassar 20.000 céls/mm³ (Wanduragala e Ristic, 1993).

O ponto máximo da anemia, com o valor do hematócrito podendo cair abaixo de 10%, ocorre entre um e três dias após o pico de parasitemia. O número de células eliminadas não é proporcional ao número de células parasitadas, devido à destruição imunomediada de eritrócitos não parasitados pelas células do SMF e por imunoglobulinas (Jain, 1986; Losos, 1986; Richey, 1993).

Quatro ou cinco dias após o pico de anemia, pode haver tão poucas células parasitadas que o diagnóstico pelo esfregaço sanguíneo torna-se praticamente impossível, por isso esses exames não devem ser realizados muitos dias após o pico de parasitemia e a crise hemolítica (Jain, 1986).

Nos casos fatais, a morte dos animais pode estar diretamente ligada à anemia, mas a elaboração de um prognóstico baseado no grau da anemia é difícil. Baixos níveis de potássio plasmático, atraso na reticulocitose e acidose metabólica não compensada estão associados à mortalidade (Allen e Kuttler, 1981).

Diversos estudos do quadro hematológico na anaplasose demonstram a ocorrência de uma anemia do tipo regenerativa,

normocítica e normocrômica durante a fase de patência, evoluindo para uma anemia macrocítica e normocrômica no período convalescente. É comum a observação de anisocitose, policromasia (Thrall, 2004) e a presença de reticulócitos no esfregaço sangüíneo indica um prognóstico favorável (Allen e Kutler, 1981).

2.2.6. Leucograma

A contagem de leucócitos totais nos bovinos pode apresentar pouca variação, mesmo durante inflamações agudas. Por isso, é necessário realizar contagem diferencial para auxiliar na investigação de doenças inflamatórias. Os bovinos apresentam menor número de neutrófilos circulantes e pequena reserva medular de leucócitos. Os linfócitos e eosinófilos circulantes são mais numerosos do que nas outras espécies (Coles, 1986; Dirksen *et al.*, 1993; Thrall, 2004).

As alterações leucocitárias podem ser causadas pela liberação de adrenalina, corticosteróides e citocinas. A adrenalina causa uma leucocitose fisiológica, pela elevação da pressão sanguínea e a ocorrência de contração esplênica, promovendo a liberação de leucócitos marginais para a corrente circulatória. A elevação da contagem de leucócitos é moderada, observando-se neutrofilia, linfocitose, eosinopenia e contagens variáveis de monócitos (Jain, 1986; Meyer *et al.*, 1995).

Fatores intrínsecos, como raça, idade, sexo e estado fisiológico, e fatores extrínsecos, como manejo e estação do ano, podem influenciar nos resultados do leucograma em bovinos, alterando as contagens total e diferencial de leucócitos (Thrall, 2004).

Os valores de referência para o número de leucócitos em bovinos jovens variam de 5.000 a 12.000/mm³ (Dirksen *et al.*, 1993). O leucograma na anaplasiose revela uma leucocitose, devido ao aumento de linfócitos e neutrófilos segmentados (Losos, 1986; Wanduragala e Ristic, 1993).

2.3. Homeostase

Há um equilíbrio dinâmico entre os fluidos corporais, principalmente os extracelulares (LEC), pois no espaço intravascular as forças osmótica e hidrostática regulam o fluxo de água. A pressão osmótica e o volume do LEC são determinados em grande parte pela concentração do Na⁺, uma vez que água tende a fluir para dentro ou para fora dos compartimentos, em resposta às alterações deste íon (Meyer *et al.*, 1995).

A água representa 60% do peso corporal de um adulto e entre 70 a 80% dos jovens. Dois terços da água do organismo compõem os fluidos intracelulares (LIC) e um terço os extracelulares (LEC), sendo este último dividido entre o plasma (25%) e os líquidos intersticiais (75%) (Meyer *et al.*, 1995). Perdas de até 5% raramente induzem a manifestação de sinais clínicos. No entanto, uma desidratação de 15% pode provocar a morte do animal (Cunningham, 1993).

Os principais íons presentes no LIC são o K⁺ e os PO₄⁻³ e os principais eletrólitos do LEC são o Na⁺ e o Cl⁻, além dos íons HCO₃⁻. A osmolaridade varia de 280 a 320 mEq/L (Di Bartola, 2000).

2.3.1. Sódio (Na⁺)

O Na⁺ é o íon mais abundante no LEC, sendo primariamente responsável pela manutenção da pressão osmótica e pelo equilíbrio ácido-básico, juntamente com o K⁺ e Cl⁻. Além disso, o Na⁺ é essencial para o desenvolvimento do potencial de membrana, que é de fundamental importância para várias funções celulares especializadas, como as contrações musculares, cardíacas e a transmissão de impulsos nervosos. A manutenção da sua concentração corporal é controlada unicamente pela ingestão e excreção (Di Bartola, 2000).

A distribuição do Na⁺ no espaço intravascular é bem diferente daquela prevista pelo potencial de membrana, sendo compensada por um sistema enzimático com gasto energético (Bomba Na⁺/K⁺-

ATPase), que retira o Na^+ e introduz K^+ no interior das células (Tietz, *et al.*, 1994).

As concentrações de Na^+ nos vegetais são muito pequenas e não são suficientes para atender aos requisitos nutricionais dos herbívoros, que necessitam de suplementação na dieta. De maneira geral, os requerimentos dietéticos de Na^+ são controlados pelas perdas do mineral pelo organismo. As necessidades de Na^+ variam conforme a temperatura ambiente, a capacidade produtiva e o nível de atividade do animal. Elevados níveis de K^+ na dieta aumentam os requisitos de Na^+ (Tasker, 1971; Cunningham, 1993).

O Na^+ é excretado através do suor, nas fezes dos bovinos e eqüinos e, principalmente, pelos rins. Cerca de 90% do Na^+ que passa pelos glomérulos é reabsorvido nos túbulos proximais e nas alças de Henle, dependendo da sua concentração no organismo. A aldosterona e o hormônio anti-diurético (ADH) são os principais hormônios controladores das concentrações de Na^+ , mantendo equilibrada a relação entre $\text{Na}^+:\text{K}^+$. Em caso de hipernatremia, a secreção de aldosterona é reduzida, diminuindo a reabsorção de Na^+ . Nos casos de hiponatremia, ocorre aumento da secreção, promovendo maior reabsorção renal. O ADH é responsável pelas mudanças na pressão osmótica do LEC. Em casos de hiponatremia, ocorre inibição da sua secreção, causando aumento da excreção renal de água e conseqüentemente redução do LEC e do volume sanguíneo circulante, levando à hipotensão e a distúrbios na circulação periférica (Tietz, *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1995; Di Bartola, 2000).

Cerca de metade do Na^+ orgânico está contido no LEC, onde exerce seu maior efeito fisiológico e, do restante, a maior parte está nos ossos. No LIC, as concentrações de Na^+ são muito reduzidas (Tasker, 1971).

Os níveis séricos normais de Na^+ para os bovinos variam entre 132 e 152 mmol/L (Meyer *et al.*, 1995). Durante o período patente da anaplasnose, Allen e Kutler (1981) observaram redução das

concentrações sanguíneas de Na^+ , mas sem ultrapassar os limites fisiológicos.

2.3.2. Potássio (K^+)

O K^+ é o maior responsável pela manutenção da pressão osmótica intracelular, sendo essencial para inúmeras funções bioquímicas e fisiológicas do organismo. A concentração de K^+ no LEC influencia o desenvolvimento dos potenciais de membrana, estando relacionado às transmissões nervosas e às contrações musculares. O K^+ também influencia o metabolismo de carboidratos e o transporte de elétrons, uma vez que várias enzimas que compõem estas vias metabólicas são dependentes de K^+ (Tietz, *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1995; Di Bartola, 2000).

O K^+ é o mais abundante íon do LIC de plantas e animais. Por isso, este elemento está presente em altas concentrações na maioria dos alimentos e a deficiência de K^+ é raramente observada nas dietas (Tasker, 1971; Tietz, *et al.*, 1994).

Devido à alta ingestão de K^+ pelos animais, grandes quantidades deste íon necessitam ser excretadas para evitar intoxicação do organismo. A maior parte é excretada pela urina. O suor, as secreções do trato digestivo e as fezes, principalmente dos bovinos e eqüinos, também contribuem para a sua eliminação (Tasker, 1971).

Normalmente, há pouca necessidade de retenção de K^+ no organismo e os rins atuam principalmente para evitar o acúmulo deste íon em quantidades tóxicas. Em casos de interrupção da ingestão, a reabsorção renal de K^+ se faz necessária, porém, os rins têm baixa capacidade de retenção de K^+ (Cunningham, 1993; Meyer *et al.*, 1995; Di Bartola, 2000).

As concentrações de K^+ no LEC são baixíssimas e, em condições normais, cerca de 90% do K^+ do organismo está no LIC, principalmente no tecido muscular (Tasker, 1971).

Os níveis séricos normais de K^+ para os bovinos variam entre 3,8 a 6,0 mmol/L (Meyer *et al.*, 1995). Durante a fase de desenvolvimento da anaplasnose, Allen e

Kutler (1981) observaram redução significativa das concentrações sanguíneas de K^+ em casos fatais da doença e associaram esta redução diretamente à mortalidade dos animais, juntamente com outros fatores discutidos adiante.

2.3.3 Cloro (Cl^-)

O mais abundante ânion do LEC é o Cl^- , estando presente apenas em baixas concentrações no LIC. O Cl^- está presente nos alimentos, normalmente associado ao Na^+ ou K^+ . Sua absorção, distribuição e excreção ocorrem de forma passiva, uma vez que este íon normalmente acompanha o Na^+ , sendo distribuído de acordo com os gradientes elétricos originados pelo transporte ativo do Na^+ (Tasker, 1971; Cunningham, 1993; Di Bartola, 2000).

Os níveis séricos normais de Cl^- para os bovinos variam entre 97 e 111 mmol/L (Meyer *et al.*, 1995). Durante a fase de patência da anaplasiose, Allen e Kutler (1981) observaram redução das concentrações sanguíneas de Cl^- , mas não ultrapassando os limites fisiológicos.

2.4 Equilíbrio Ácido-Básico

Os processos bioquímicos normais do corpo são altamente influenciados por enzimas intracelulares. Estas reações enzimáticas ocorrem com maior eficiência somente entre uma pequena faixa de variação do pH. Por isso, a regulação e a manutenção do pH dos fluidos corporais em níveis normais são de fundamental importância, uma vez que o balanço hidroeletrólítico está altamente relacionado com o equilíbrio ácido-base e as doenças que alteram um desses parâmetros influenciam a ocorrência de alterações nos outros (Cunningham, 1993; Meyer *et al.*, 1995; Di Bartola, 2000).

O equilíbrio ácido-básico envolve o balanço de CO_2 , de ácidos diferentes do carbônico e de bases. O pH normal do sangue varia entre 7,31 a 7,41 e sua manutenção é essencial para o pleno funcionamento dos processos metabólicos e celulares. Três sistemas são responsáveis pela manutenção da homeostase ácido-básica: os tampões

intra e extracelulares e o sistema respiratório, que são responsáveis por correções rápidas das alterações do pH, e os rins, responsáveis por correções de longo prazo e pela excreção dos íons H^+ em excesso (Cunningham, 1993; Di Bartola, 2000).

Existem diversos tampões intra e extracelulares, como a hemoglobina e outras proteínas, o carbonato dos ossos, os fosfatos e o bicarbonato, que agem para titular o H^+ e manter o pH dentro dos limites fisiológicos, neutralizando rapidamente alterações agudas na carga ácida, desde que sua capacidade tampoadora não seja excedida (Cunningham, 1993).

A ação dos tampões na regulação do pH pode ser explicada tomando-se como exemplo o sistema-tampão bicarbonato, no qual os íons de hidrogênio (H^+) reagem com o bicarbonato (HCO_3^-), formando o ácido carbônico (H_2CO_3) e, posteriormente, gás carbônico (CO_2) e água (H_2O) (Tietz *et al.*, 1994).



O sistema-tampão bicarbonato é o mais importante do plasma, sendo sua eficácia devido à sua alta concentração plasmática e ao fato do CO_2 poder ser prontamente eliminado pelos pulmões, além da possibilidade de retenção de HCO_3^- pelos rins. Outro importante sistema-tampão do plasma é o das proteínas, que completa a ação do bicarbonato. Os principais tampões intracelulares são os fosfatos (HPO_4^{2-}) e a hemoglobina (Tietz *et al.*, 1994; Di Bartola, 2000).

Os pulmões têm papel importante na manutenção do pH sanguíneo dentro dos níveis normais, principalmente em resposta a alterações rápidas na carga ácida, alterando a taxa de remoção de CO_2 do sangue e, conseqüentemente, reduzindo a concentração de ácido carbônico (H_2CO_3) (Cunningham, 1993; Tietz *et al.*, 1994).

Os rins compõem a terceira linha de defesa ao equilíbrio ácido-base, sendo responsáveis pela excreção do H^+ e retenção

de HCO_3^- (Cunningham, 1993; Meyer *et al.*, 1995).

2.4.1. pH

O pH do sangue venoso varia entre 7,31 e 7,41, valores menores que 7,31 indicam acidose e maiores que 7,41, alcalose. O valor do pH é igual ao logaritmo negativo da concentração de H^+ (Tietz, *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1995; Di Bartola, 2000). Allen e Kutler (1981), observaram redução acentuada do pH do sangue, durante a fase de patência da anaplasmosose nos casos fatais da doença e aumento nos casos não-fatais, indicando a compensação da acidose metabólica.

2.4.2. Bicarbonato (HCO_3^-)

Os íons bicarbonato são de fundamental importância na manutenção do equilíbrio ácido-base do organismo. A maioria do bicarbonato é de origem endógena, sendo produzido a partir da hidratação do CO_2 das células, originando o ácido carbônico e, posteriormente, da dissociação deste ácido em íons bicarbonato e hidrogênio. Sua eliminação é feita pelas secreções do trato digestivo e pela urina (Cunningham, 1993; Tietz *et al.*, 1994; Di Bartola, 2000).

O HCO_3^- é o componente metabólico alcalinizante do equilíbrio ácido-básico e indica a capacidade de tamponamento do sangue. As principais causas de acidose metabólica primária, quando há redução do HCO_3^- , são a cetose, a acidose láctica e a diarreia. Já as principais causas de alcalose metabólica primária são os vômitos (Cunningham, 1993; Tasker Tietz *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1995).

O valor fisiológico de HCO_3^- plasmático é de 27 mmol/L nos bovinos (Meyer *et al.*, 1995). Allen e Kutler (1981), observaram redução nas concentrações de HCO_3^- durante o período de patência da anaplasmosose.

2.4.3. Pressão Parcial de Dióxido de Carbono (pCO_2)

O CO_2 é o componente respiratório acidificante do equilíbrio ácido-básico e,

juntamente com o pH, a pCO_2 é utilizada para avaliação deste equilíbrio, sendo uma medida da tensão ou pressão de CO_2 dissolvido no sangue, que reflete o equilíbrio entre sua produção pelas células do organismo e sua remoção pelos pulmões. O aumento da pCO_2 é chamado de acidose respiratória primária podendo ocorrer em casos de obstrução das vias respiratórias, pneumonias e durante anestesia ou sedação. A alcalose respiratória (redução da pCO_2) pode ocorrer em casos de hiperventilação mecânica ou ser provocada por distúrbios neurológicos (Tietz, *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1995; Di Bartola, 2000).

Os níveis fisiológicos da pCO_2 variam entre 34,7 e 44 mmHg nos bovinos (Tasker, 1971). Allen e Kutler (1981), observaram redução na pCO_2 durante o período de patência da anaplasmosose.

2.4.4. Dióxido de carbono Total (tCO_2)

É a soma das concentrações de bicarbonato (maior parte do CO_2) e CO_2 dissolvido, dando uma indicação grosseira da situação ácido-básica. Valores de tCO_2 reduzidos são indicativos de acidose e aumentados indicam alcalose. A influência de fatores metabólicos e respiratórios limita o valor de interpretação da tCO_2 (Meyer *et al.*, 1995).

Os níveis fisiológicos de tCO_2 variam entre 25,6 e 33,4 mmHg nos bovinos (Tasker, 1971). Allen e Kutler (1981), observaram redução na tCO_2 durante o período de patência da anaplasmosose.

2.4.5. Excesso de Bases (BE)

O BE é o valor da diferença entre o total de bases tituláveis e o de ácidos tituláveis. Um valor positivo indica um excesso de base (HCO_3^-) ou alcalose e um valor negativo, indica deficiência de base (redução de HCO_3^-) ou acidose. É uma medida utilizada para investigar alterações metabólicas e a vantagem da sua utilização na avaliação do estado ácido-básico é que este valor permanece praticamente constante durante

alterações agudas da $p\text{CO}_2$, refletindo apenas o conteúdo não respiratório das alterações do pH no fluido extracelular (Tietz, *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1995). Allen e Kutler (1981), observaram redução no BE durante o período de patência da anaplasnose.

2.4.6. Diferença Aniônica (Anion Gap - AG)

É a diferença entre os cátions Na^+ e K^+ e os ânions Cl^- e HCO_3^- , sendo representada na equação:

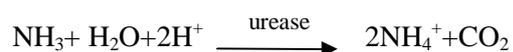
$$\text{AG} = (\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-)$$

O tamanho da diferença reflete o intervalo entre os cátions e ânions não mensurados (fosfato, sulfato, lactato, cetonas). O limite normal é entre 12 a 18 mEq/L e a AG pode ser utilizada para classificar o grau de acidose metabólica em “alta” ou “normal”, auxiliando na detecção de um aumento de ânions que são difíceis de medir (Tietz, *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1995; Di Bartola, 2000). Allen e Kutler (1981), observaram aumento na AG durante o período patente da anaplasnose.

2.5. Parâmetros Bioquímicos

2.5.1. Uréia Nitrogenada (BUN)

A uréia é hidrolisada em íons de amônio na reação catalisada pela urease:



O aumento da uréia nitrogenada no sangue é indicativo de disfunções renais e pode ocorrer em casos de hemorragia gastrointestinal e em dietas com excesso de proteínas. Em casos de desnutrição, insuficiência hepática e hiper-hidratação, ocorre redução nos valores séricos de BUN (Tasker, 1971; Cunningham, 1993; Thrall, 2004).

Os níveis fisiológicos de BUN variam entre 20 a 30 mg/mL nos bovinos (Meyer *et al.*, 1995). Allen e Kutler (1981), observaram aumento nas concentrações séricas de BUN, durante a fase de patência da anaplasnose, mas não o suficiente para indicar a ocorrência de lesão glomerular.

2.5.2. Glicose

A glicose é a única fonte de energia para o sistema nervoso central (SNC) e é fonte de energia primária para os outros tecidos. Suas concentrações sanguíneas são altamente influenciadas pela ingestão de alimentos e reguladas pelos hormônios pancreáticos, insulina e glucagon. Os níveis fisiológicos de glicose variam entre 45 a 75 mg/mL nos bovinos (Meyer *et al.*, 1995) e não foram encontrados relatos sobre o comportamento da glicose sanguínea na anaplasnose.

2.5.3. Proteínas Totais

As proteínas plasmáticas são sintetizadas principalmente no fígado e a sua mensuração pode ser utilizada para avaliar a integridade hepática e também da função renal, por estar relacionada ao mecanismo de filtração glomerular. Também representa, indiretamente, a condição nutricional do animal (Jain, 1986; Meyer *et al.*, 1995). A hipoproteinemia pode ser observada nas anemias hemorrágicas, diarreia, carência nutricional, parasitismo intestinal grave, hepatopatia ou doença renal grave.

Os valores de referência para proteínas plasmáticas em bovinos variam entre 6,0 a 8,5 g/dL (Dirksen *et al.*, 1993). Segundo Losos (1986), após o pico de parasitemia, acompanhando a anemia, ocorre aumento das proteínas séricas totais devido ao aumento das globulinas.

2.6. Urinálise

Há poucos relatos na literatura sobre as alterações nos exames de urina, provocadas pela anaplasnose. Allbitron e Seger (1962), relataram o aumento da excreção urinária de bilirrubina e urobilinogênio, na fase de patência da anaplasnose. Não foram encontrados outros relatos sobre as alterações nos exames de urina durante a doença.

2.6.1. Densidade específica (DE)

A densidade específica é a razão entre a massa de uma solução comparada à mesma massa de água. Ela não é uma mensuração direta do número de partículas de um soluto, como a osmolaridade, mas as duas determinações estão relacionadas. O teste da DE é de grande significado clínico, pois reflete a habilidade dos rins em concentrar urina. A perda dessa capacidade é um dos primeiros sinais de doença tubular renal. A DE do filtrado glomerular pode variar entre 1,001 a 1,060, dependendo do grau de hidratação do animal. Normalmente, o valor da DE está entre 1,020 a 1,040 e para que ocorra variação além desses limites, é necessária a atuação das células tubulares renais (Dirksen *et al.*, 1993).

2.6.2. pH

O pH da urina depende da dieta. Os herbívoros apresentam um pH urinário alcalino. O aumento da acidez da urina pode ser resultado da privação de alimentos, febre, acidose metabólica ou respiratória, esforço muscular prolongado ou da administração de sais ácidos, como o cloreto de amônio. O aumento da alcalinidade pode ser provocado por alcalose metabólica ou respiratória, por uma cistite bacteriana ou pela ingestão de bicarbonato de sódio (Meyer *et al.*, 1995).

2.6.3. Proteínas

Normalmente, a pequena quantidade de proteínas que atinge o filtrado glomerular é reabsorvida, não sendo normal encontrar resultados positivos para proteína na urina. Numa urina concentrada (DE > 1,050), reações de traço a uma cruz podem ser consideradas normais. Por outro lado, se a densidade estiver baixa, o resultado deve ser considerado anormal. A febre, fadiga muscular e o estresse podem causar uma leve proteinúria transitória (Meyer *et al.*, 1995).

2.6.4. Glicose

A avaliação da glicose na urina deve ser acompanhada por uma avaliação simultânea da glicose sanguínea. A glicose passa para o filtrado glomerular e é completamente reabsorvida pelas células tubulares, não sendo detectada na urina normal. A causa mais comum de glicosúria é o excesso de glicose no sangue, superando a capacidade de reabsorção tubular renal. Em ruminantes, o limiar de absorção renal de glicose é de, no máximo, 80mg/mL (Fettman e Rebar, 2004).

2.6.5. Corpos Cetônicos

Assim como a glicose, os corpos cetônicos são detectados na urina quando sua concentração sanguínea excede o limiar de absorção no filtrado glomerular. Cetose e cetonúria refletem uma produção exagerada de corpos cetônicos, que ocorre quando a taxa de mobilização de gordura, dos depósitos de reserva corporal, excede a capacidade hepática de oxidação ou de conjugação com lipoproteínas. O aparecimento dos corpos cetônicos na urina ocorre em diversas condições quando a disponibilidade de glicose é limitada (Fettman e Rebar, 2004).

2.6.6. Bilirrubina

A detecção de bilirrubina é um indicador mais específico de lesão hepática do que da função renal. A maior parte da bilirrubina conjugada vem do sangue e o seu aumento é indicativo de colestase. Contudo, outros distúrbios, como as anemias hemolíticas, podem provocar o aumento da formação de bilirrubina conjugada pelo fígado e a sua excreção urinária (Fettman e Rebar, 2004).

2.6.7. Sangue Oculto

Uma reação positiva é indicativa da presença de hemácias, hemoglobina livre ou mioglobina. Deve-se suspeitar de mioglobinúria se houver aumento concomitante da atividade da creatinina cinase (CK) no soro. A hematúria reflete a presença de hemorragia no trato urinário e pode ser confirmada verificando-se a

presença de hemácias em um exame microscópico dos sedimentos. A hemoglobinúria sugere a destruição intravascular de eritrócitos e geralmente, é acompanhada de sinais clínicos de anemia ou icterícia (Fettman e Rebar, 2004).

3. Material e Métodos

O trabalho foi dividido em dois experimentos. No primeiro, foi observada a evolução da anaplasiose, induzida experimentalmente pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice. No segundo, foram avaliadas as alterações nos parâmetros clínicos e de patologia clínica, durante a fase de patência da anaplasiose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice.

3.1. Local e período

Os experimentos foram realizados na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, no período de 07 de julho a 05 de outubro de 2006. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas desta Instituição.

3.2. Animais

Foram utilizados onze bezerros machos, da raça Holandesa Preta e Branca (HPB), nascidos entre os dias 25 de maio a 04 de junho em uma propriedade de exploração leiteira situada no município de Inhaúma, Minas Gerais. Para realização deste trabalho, foram utilizados seis bezerros no Experimento I e outros cinco no Experimento II, distribuídos aleatoriamente.

Após o nascimento, todos os bezerros receberam dois litros de colostro, de suas respectivas mães, nas primeiras duas horas após o nascimento e foram alojados em sistema de casinha, com piso de areia. Os animais foram alimentados com quatro litros de leite, 500g de ração por dia e água à vontade e permaneceram na propriedade até o dia 06 de julho de 2006, quando foram transferidos para as instalações da Escola de Veterinária.

No dia 08 de junho de 2006, foi coletado sangue de todos os animais, por punção da veia jugular, para realização de exames de reação em cadeia de polimerase (PCR) (Lew *et al.*, 2002), confirmando que todos eram negativos para *Anaplasma marginale*. Também foram realizados exames de imunofluorescência indireta (RIFI), confirmando a presença de anticorpos contra o *A. marginale*, fornecidos pelo colostro.

No dia 07 de julho, os bezerros foram transferidos para as instalações do pavilhão da Clínica de Ruminantes do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, um galpão de alvenaria com 50m de comprimento por 25m de largura.

No galpão, os animais foram criados em sistema “tie-stall”, com camas de serragem. Cada animal dispunha de uma área de 2m², um cocho com 60x40x20cm e um balde galvanizado e graduado, para o fornecimento de ração e água, respectivamente.

Todos os animais receberam quatro litros de raspa de leite em pó¹ (130g/L de água) até os 45 dias de idade. Tinham água e alimento (ração e feno) à vontade e passaram por um período de adaptação de uma semana antes do experimento. Os bezerros eram banhados semanalmente com produto à base de Cipermertrina² (1mL/20L de água-mg/mL), para controle de carrapatos e moscas.

3.3. Experimentos

3.3.1. Experimento I

Foram utilizados onze bezerros HPB, com idade variando entre 30 a 40 dias, pesando entre 36 a 70 kg, selecionados aleatoriamente. No dia 10 de junho de 2006, seis animais foram inoculados com amostra de *Anaplasma marginale*, com apêndice, caracterizada por Ribeiro *et al.* (1997), multiplicada em bezerro esplenectomizado e criopreservada em

¹ Raspa de leite – Itambé - Brasil

² Fly-tick – Valeé – Brasil

DMSO, formando o Grupo 1. Os outros cinco animais foram inoculados com solução salina, formando o Grupo Controle. Foram realizados, diariamente, exames físicos para avaliação dos sinais clínicos e coletas de sangue para avaliação do hematócrito e do grau de parasitemia de todos os animais, sendo contados 10 campos de 200 células em cada lâmina. Os exames foram realizados entre os dias 07 de julho a 20 de agosto de 2006. Neste experimento, avaliou-se o comportamento clínico da anaplasiose durante os períodos de patência, convalescência e na fase de portador.

3.3.2. Experimento II

Nesta etapa, foram utilizados os cinco bezerros HPB, que compunham o Grupo Controle do Experimento I, com idade variando entre 110 a 120 dias, pesando entre 83 a 112 kg, e comprovadamente negativos para o agente. No dia 20 de agosto de 2006, os animais receberam uma cepa de *Anaplasma marginale* sem apêndice, obtida a partir de um animal naturalmente infectado e reproduzida em bezerro esplenectomizado, e foram retirados do Experimento I. Além dos exames realizados diariamente no Experimento I, foram avaliados o perfil eletrolítico e gasométrico do sangue, o hemograma e as alterações na urina dos animais do Experimento II. As coletas foram realizadas a partir do início das manifestações clínicas ou de um aumento da parasitemia entre os dias 15 de setembro a 05 de outubro de 2006.

Neste experimento, avaliou-se o comportamento clínico e dos parâmetros bioquímicos, o perfil eletrolítico e o equilíbrio ácido-básico da anaplasiose, durante a fase de patência.

3.4. Inóculos

3.4.1. Amostra com apêndice

Os bezerros do Experimento I foram inoculados, por via endovenosa com uma cepa de baixa patogenicidade, de *A. marginale* com apêndice (comunicação

peçoal, Ribeiro, 2006), obtida a partir de um animal naturalmente infectado e cultivada nos Laboratórios do Departamento de Protozoologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e criopreservada em nitrogênio líquido, utilizando dimetilsulfóxido como crioprotetor. Os animais receberam um inóculo contendo 10^7 hemácias parasitadas reproduzido em bezerro esplenectomizado.

3.4.2. Amostra sem apêndice

No Experimento II, os animais foram inoculados, por via endovenosa, com 10^7 hemácias parasitadas por *Anaplasma marginale* sem apêndice, obtida a partir de um animal naturalmente infectado e cultivada nos Laboratórios do Departamento de Protozoologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, criopreservada em nitrogênio líquido com dimetilsulfóxido como crioprotetor.

3.5. Coleta de Dados

3.5.1. Exames Físicos

Os exames físicos foram realizados diariamente, entre as oito e nove horas da manhã, no período de adaptação e após as inoculações durante as fases de patência, convalescência e portador, no Experimento I e de patência e convalescência, no segundo experimento. A temperatura e as frequências cardíaca e respiratória foram avaliadas, juntamente com os seguintes parâmetros clínicos qualitativos: coloração das mucosas, tipo e modo respiratórios, presença de secreção nasal e reflexo de tosse, tipo de fezes, comportamento, apetite e grau de desidratação. Para avaliação destes parâmetros, foi criado um escore numérico para facilitar a realização das análises estatísticas (Quadro 1). Os valores obtidos para os parâmetros clínicos descritos no Quadro 1 foram somados, criando um escore único para a condição física geral dos animais (EEF geral). Também foram somados os valores inter-relacionados, criando escores para avaliação do comprometimento do sistema

respiratório (EEF resp), do grau de hidratação e tipo fezes (EEF hidr), depressão de comportamento e do apetite (EEF comp). O escore de coloração de

mucosas (EEF muc) foi avaliado individualmente. A interpretação da pontuação dos exames de cada sistema está descrita na *Tabela 2*.

Tabela 2 - Escore de Exame Físico

Respiração	1 = Eupnéia 2 = Dispnéia (Mista, Inspiratória ou Expiratória)
Tipo de Respiração	1 = Costo-abdominal 2 = Abdominal
Mucosas	1 = Normocoradas 2 = Hipocoradas 3 = Pálidas 4 = Ictéricas
Fezes	1 = Normais – Fezes bem formadas 2 = Diarréia Moderada – Fezes Pastosas 3 = Diarréia Intensa – Fezes Liquefeitas
Apetite	1 = Bom = Animal alimenta-se freqüentemente, com avidez pelo alimento 2 = Reduzido = Animal alimenta-se ocasionalmente, com pouco interesse pelo alimento 3 = Ausente = Animal não se alimenta ou demonstra interesse pelo alimento
Grau de Hidratação	1 = Normal – Olhos e mucosas brilhantes e turgor de pele normal. 2 = Moderada – Endoftalmia discreta, focinho seco, mucosa oral pegajosa, redução do turgor de pele. 3 = Severa – Endoftalmia evidente, redução acentuada do turgor de pele, mucosas ressecadas e extremidades frias
Comportamento	1 = Normal 2 = Apático = Bezerro fraco, fica de pé e alimenta-se com menor freqüência 3 = Deprimido = Animal incapaz de se levantar e alimentar-se

Tabela 3 – Interpretação da pontuação de Escore de Exame Físico (EEF)

EEF	Grau de Comprometimento no Exame Físico			
	Min/Máx	Normal	Moderado	Grave
Geral	7 – 20	7 – 9	11 – 13	15 – 20
Comp	2 – 6	2 – 3	3 – 4	4,1 – 6
Hidr	2 – 6	2 – 3	3 – 4	4,1 – 6
Resp	2 – 4	2	3	4
Muc	1 – 4	1	2	3 – 4

3.5.2. Coleta de Material

Nos dois experimentos, após a realização dos exames físicos diários, ainda no período da manhã, foram realizadas as coletas de sangue dos vasos da orelha em tubo capilar, para determinação do volume globular, pela técnica de microhematócrito, e da ponta da cauda, para confecção de lâminas de

esfregaço sangüíneo, para avaliação da parasitemia (Jain, 1986).

Nos dias 15, 18, 21, 22, 23, 24, 26, 28 e 30 de setembro e 02 e 05 de outubro, no período da manhã, foram realizadas as coletas de sangue e urina para realização das análises laboratoriais do Experimento II. O sangue foi coletado por punção da veia jugular em seringa estéril de 3mL, sem anti-coagulante, utilizando agulha

descartável estéril, de calibre 25x7, para análise imediata dos parâmetros hemogasométricos, do perfil eletrolítico e do pH. Também foram realizadas coletas de sangue em sistema à vácuo, em tubos com EDTA, para realização de hemograma. A urina foi coletada em frasco estéril, por estimulação manual através de massagem prepucial.

3.5.3. Análises Laboratoriais

As análises do pH, pCO₂, tCO₂, bicarbonato, excesso de bases, diferença aniônica e das concentrações de sódio, potássio, cloro, glicose, uréia e hemoglobina foram realizadas no i-Stat³ (analisador portátil), imediatamente após a coleta com a utilização de um cartucho, no qual foram instiladas duas gotas de sangue sem anticoagulante para realização das análises, apresentando os resultados em cerca de dois minutos.

Os hemogramas foram realizados no mesmo dia da coleta, no contador automático de células⁴ e a contagem diferencial e leucócitos, foi realizada diretamente em esfregaço sanguíneo, em microscópio óptico⁵, com objetiva de imersão.

A urina foi analisada por fita de urinálise⁶ e a densidade foi avaliada com a utilização de um refratômetro, imediatamente após a coleta.

3.6. Análises Estatísticas

Os resultados obtidos nos exames físicos dos Experimentos I e II foram avaliados pela estatística descritiva, obtendo-se as médias e desvios-padrão de cada parâmetro, para a descrição do seu comportamento.

Como o período de incubação e as manifestações clínicas da doença variam, de acordo com cada animal, os dados foram ajustados de forma que o dia de menor

valor de hematócrito, que foi considerado o dia zero, coincidissem para todos os animais, permitindo a avaliação das alterações de acordo com grau de anemia.

Os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros eletrolíticos, ácido-básicos e de patologia clínica foram comparados com o valor do hematócrito e com os parâmetros clínicos relacionados no Quadro I, nos momentos referentes às coletas de cada amostra, para verificar a existência de correlação entre estes valores.

Para avaliar as correlações entre os parâmetros clínicos e o hematócrito, nos dois experimentos, foi utilizado o método de análise de dados multidimensionais por componentes principais (SAMPAIO, 1993).

Este método pode ser utilizado quando há um número restrito de observações ou para avaliação simultânea de variáveis em relação às observações, buscando uma associação entre elas, condições observadas nos experimentos. Neste esquema de representação gráfica, observamos a existência de correlação positiva quando os pontos que representam cada parâmetro ocupam o mesmo quadrante do gráfico e, quanto mais próximos os pontos, mais forte é a correlação entre eles. Quando os pontos estão em quadrantes simetricamente opostos, observa-se a existência de correlação negativa (SAMPAIO, 1993).

Para a avaliação das correlações entre o valor do hematócrito e os parâmetros de patologia clínica avaliados no Experimento II, foram realizados cálculos de curvas de regressão linear (SAMPAIO, 1993).

As análises estatísticas de regressão e correlação foram realizadas plotando-se todos os dados em tabelas utilizando o *Microsoft Excel 2003*.

4. Resultados e Discussão

4.1. Experimento I

4.1.1. Hematócrito e Parasitemia

O período de incubação da amostra com apêndice, utilizada no Experimento I foi de

³ i-STAT Co. - Abbott Laboratories - EUA

⁴ Abacus Jr. Vet ® - Diatron - EUA

⁵ Karl Zeiss ® - Alemanha

⁶ Urofita 10DLU ® - Biobrás Diagnósticos S/A - Brasil

35 dias. A literatura indica que a duração do período de incubação, que pode variar entre 20 a 45 dias, é influenciada pelo tamanho do inóculo, pela virulência das cepas e pelo grau de imunidade contra a doença (Losos, 1986; Wandrugala e Ristic, 1993). Considerando que a fase de patência se iniciou com a primeira observação de hemácias parasitadas nos esfregaços e terminou com a estabilização da parasitemia abaixo de 1%, sua duração foi de 25 dias (entre os dias -15 a 10). Nessa fase observou-se um aumento acentuado na contagem de hemácias parasitadas, atingindo o seu valor médio máximo (7,3%) dois dias antes do pico de anemia, variando entre 0,2 e 12%. Após atingir o pico (dia -2), a parasitemia decresceu gradativamente atingindo valores abaixo de 1% por volta do dia 10. A partir daí, a se manteve em baixos níveis durante vários dias, enquanto a anemia se recuperava gradualmente, caracterizando o período convalescente, que durou cerca de 25 dias, observado entre os dias 10 e 35, quando os valores do hematócrito retornaram aos limites próximos dos fisiológicos. Durante todo o período convalescente e após a estabilização do hematócrito, observaram-se discretos aumentos na parasitemia e pequenas oscilações do hematócrito (dias 19, 40, 48, 60 e 73), indicando a ocorrência de recidivas, sem causar alterações clínicas. A ocorrência de recidivas no curso da anaplasiose é característica da fase de portador (Kieser *et al.*, 1990), embora também tenha sido observada durante o período convalescente neste experimento. Este comportamento é resultado da ocorrência de variações antigênicas nas proteínas principais de superfície (MSPs) do *Anaplasma marginale* durante o ciclo biológico, que funcionam como um mecanismo de evasão da resposta imune e também estão associadas ao desenvolvimento de uma imunidade

eficiente e duradoura contra a infecção, garantindo proteção relativa contra a doença e a manutenção da condição de portador (Kieser *et al.*, 1990).

Na fase de patência, o hematócrito mostrou redução acentuada, concomitante ao aumento da parasitemia, atingindo seu menor valor no 43º dia pós-inoculação, que foi designado como dia zero (0), para as análises desse trabalho. Neste momento, seu valor médio foi de 13%, variando entre 10 e 18%. Cinco animais, dos seis inoculados no Experimento I, apresentaram reduções de mais de 50% do hematócrito, mas se recuperaram naturalmente. A partir do dia 1, houve um aumento gradual dos valores do hematócrito demonstrando uma recuperação da anemia. Com a estabilização da parasitemia em valores baixos, em torno do dia 10, iniciou-se o período convalescente que se estendeu até o 35º dia, quando os valores do hematócrito retornaram à normalidade.

Sacco *et al.* (2001), utilizando como imunógenos cepas de *A. centrale* em novilhas da raça Hereford, com 24 meses de idade e sorologicamente negativos para o *A. marginale* e, Kessler *et al.* (1998), utilizando cepas atenuadas de *A. marginale* em novilhas da raça holandesa, encontraram resultados semelhantes, com o pico de parasitemia variando entre 3,6 e 5,5%, respectivamente, e queda significativa nos valores de hematócrito, com redução média de 30%. O comportamento da parasitemia, hematócrito e temperatura na fase de patência da anaplasiose pode ser observado nos Gráficos 1 a 3.

Os animais do Grupo Controle não apresentaram parasitemia ou reduções significativas do hematócrito durante o Experimento I.

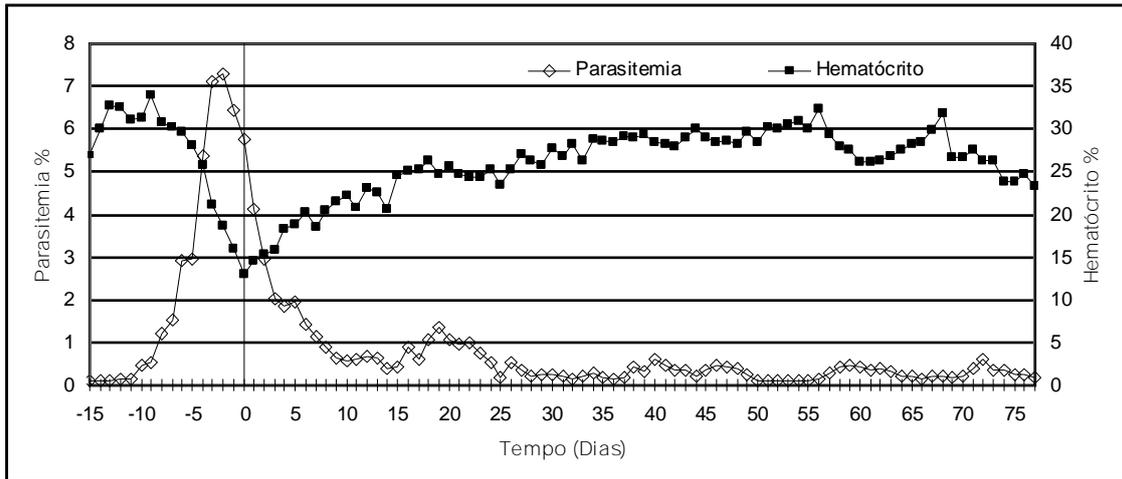


Gráfico 1 - Comportamento dos valores médios da parasitemia e do hematócrito na anaplasmosse, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros da raça holandesa preta e branca (HPB) (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

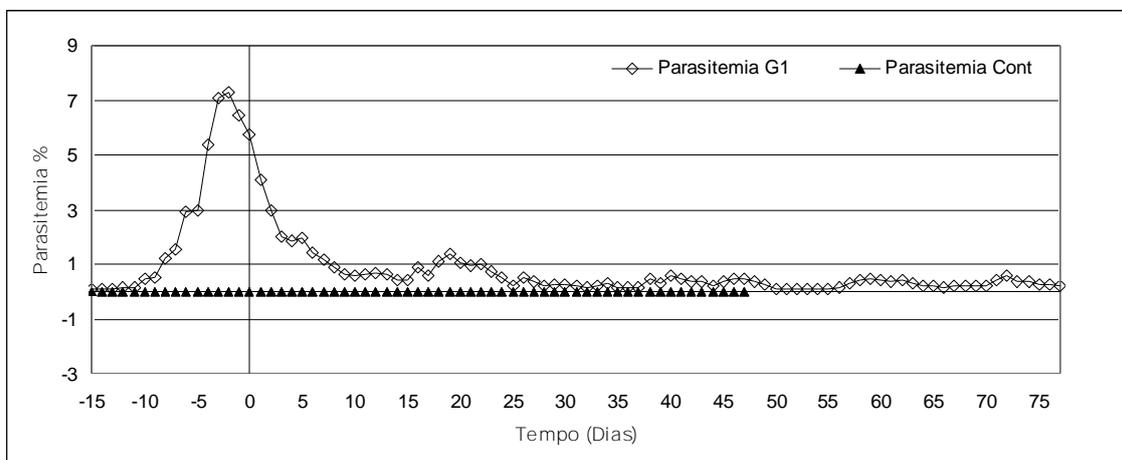


Gráfico 2 - Comportamento dos valores médios da parasitemia na anaplasmosse, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros da raça holandesa preta e branca (HPB) (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

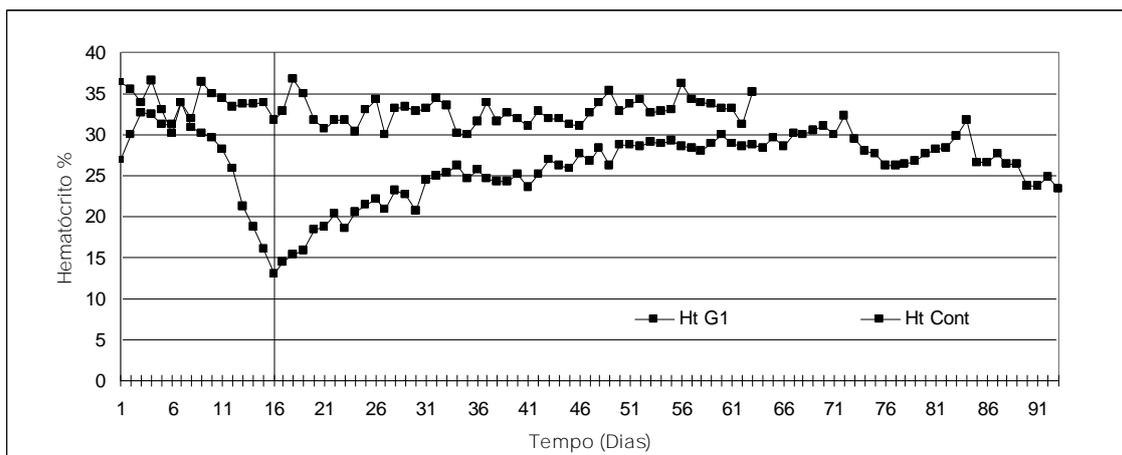


Gráfico 3 - Comportamento dos valores médios do hematócrito na anaplasmosse, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros da raça holandesa preta e branca (HPB) (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

4.1.2. Exames Físicos

4.1.2.1. Parâmetros Fisiológicos

Na análise da temperatura retal (TR), durante a fase de patência, observou-se que todos os animais apresentaram temperatura retal acima de 39,5°C, pelo menos por dois dias, antes do pico de parasitemia, como pode ser observado nos Gráficos 4 e 5. A temperatura retal apresentou correlação positiva com a parasitemia indicando que quando ocorre aumento da parasitemia ocorre também aumento na temperatura.

A febre é um estado patológico de aumento na produção e de redução na perda de calor, sendo um processo curativo e defensivo importante. Geralmente, é acompanhada de retenção de líquidos, distúrbios digestivos e aumento nas freqüências cardíaca e respiratória. Nos animais homeotérmicos, a constância da temperatura é mantida pelo funcionamento de centros regulatórios localizados na região do hipotálamo, que governam mecanismos periféricos relacionados com a perda e produção de calor. A febre é desencadeada por produtos derivados de microorganismos ou do próprio metabolismo do corpo, como as prostaglandinas, principalmente a PGE, que atuam diretamente nos centros hipotalâmicos de controle da temperatura (Dirksen *et al.*, 1993). A elevação da temperatura retal observada juntamente com o aumento da parasitemia foi

desencadeada, provavelmente, pelo aumento do número de hemácias parasitadas, potencializando a resposta imune por induzir a liberação de mediadores inflamatórios pelas células do sistema imunológico.

A ocorrência de febre e flutuações na temperatura é descrita como um sinal clínico freqüente na anaplasmoze, principalmente durante o período de aumento da parasitemia, embora não seja observada em todos os casos (Losos, 1986; Richey, 1993).

Na análise da freqüência cardíaca (FC) e da freqüência respiratória (FR) durante a fase de patência, verificou-se aumento gradual na freqüência cardíaca a partir do dia 1, após o pico de anemia. A freqüência respiratória manteve-se acima dos 40 MR/min praticamente durante todo o período convalescente, como pode ser observado nos Gráficos 6 e 7. O aumento da freqüência cardíaca e, secundariamente, da freqüência respiratória em resposta a anemia são relatados por diversos autores como sinais presentes no quadro clínico da doença (Wanduragala e Ristic, 1993; Radostits *et al.*, 2002).

Os animais do Grupo Controle não apresentaram alterações significativas nas freqüências cardíaca e respiratória e na temperatura retal durante todo o Experimento I.

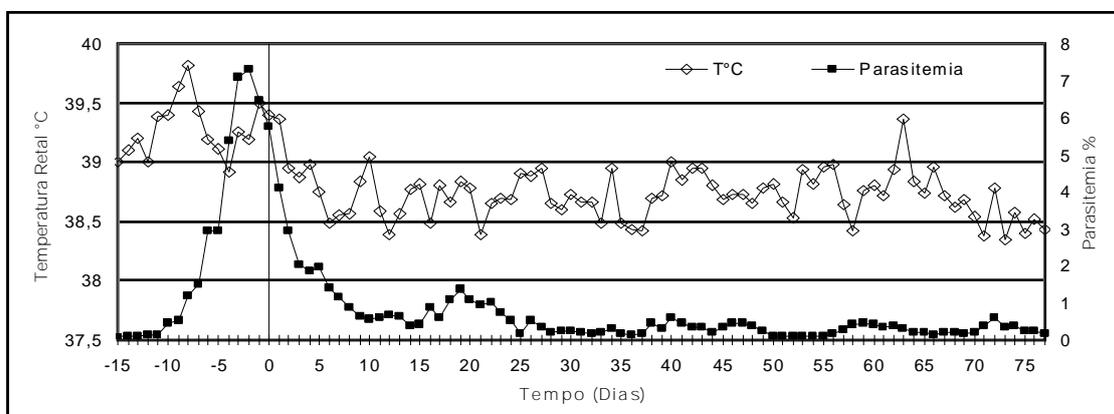


Gráfico 4 - Comportamento dos valores médios da parasitemia e da temperatura retal na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerras HPB (n=6) com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

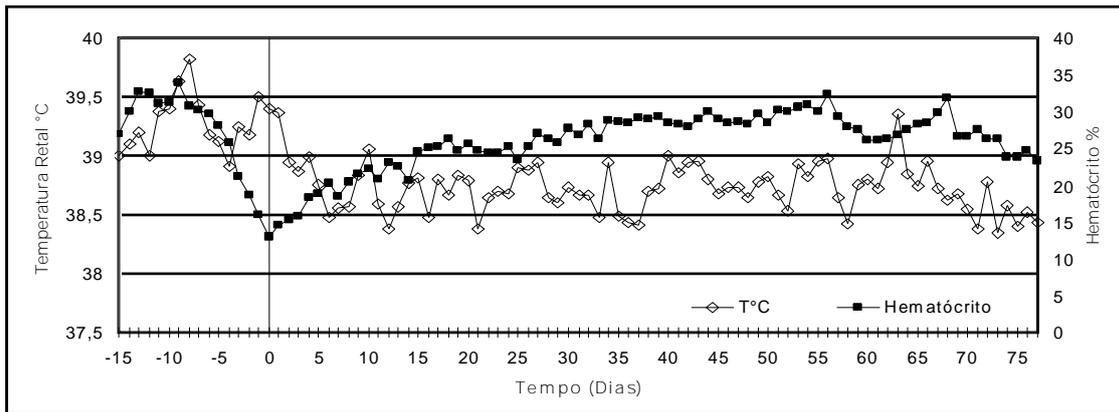


Gráfico 5 - Comportamento dos valores médios do hematócrito e da temperatura retal na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros HPB (n=6) com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

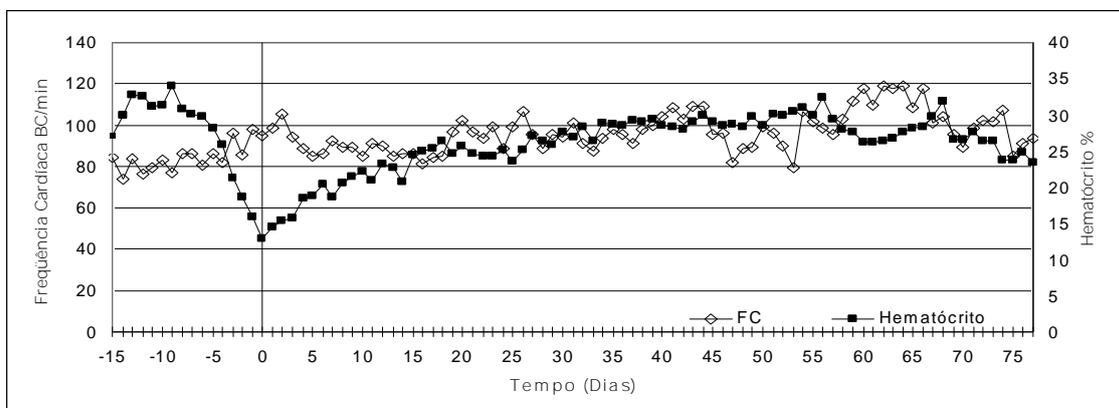


Gráfico 6 - Comportamento dos valores médios da frequência cardíaca e do hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros HPB (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

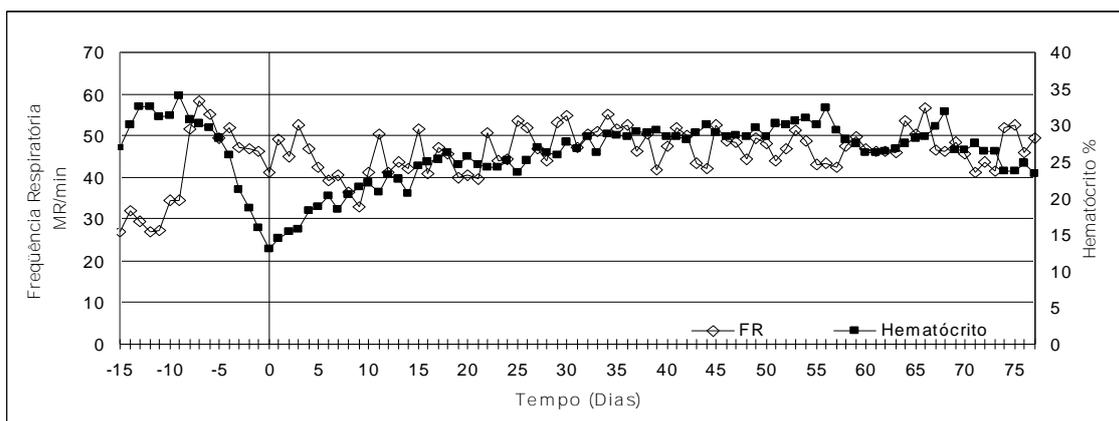


Gráfico 7 - Comportamento dos valores médios da frequência respiratória e do hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros HPB (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

4.1.2.2. Escore de Exame Físico (EEF)

Os principais sinais clínicos apresentados pelos bezerros com anaplasnose, além das alterações dos parâmetros vitais descritas anteriormente, foram: apatia, desidratação

leve, redução moderada do apetite e mucosas hipocoradas ou pálidas. As alterações foram mais intensas no dia zero, resultando em maiores valores no escore de exame físico geral (EEF geral).

Em uma análise geral do comportamento clínico da doença, a inoculação com a cepa com apêndice provocou o aparecimento de sinais clínicos moderados em apenas um animal, que se recuperou naturalmente, sem a utilização de medicamentos. Observou-se apenas uma pequena oscilação nos valores dos escores do exame físico geral, do comportamento, da coloração das mucosas, de hidratação e das alterações respiratória (Tabela 2).

Dos seis animais inoculados no Experimento I, cinco apresentaram quedas de mais de 50% do valor basal do hematócrito, mas, em apenas um deles, foram observados sinais clínicos: letargia, anorexia, mucosas pálidas, taquicardia, taquipnéia e desidratação. Nos outros animais, a única alteração encontrada no exame físico foi a observação de mucosas hipocoradas. Provavelmente, este fato foi devido às excelentes condições de instalação e à restrição à movimentação característica do sistema “Tie-stall”. Se os animais estivessem expostos às condições de campo, possivelmente os efeitos da anemia se agravariam e os sinais clínicos seriam bem mais evidentes, podendo inclusive ocorrer mortes.

Estes achados são semelhantes aos encontrados por Kessler *et al.* (1998) e Sacco *et al.* (2001), quando poucos dos animais inoculados apresentaram sinais

clínicos evidentes. Diversos autores alertam para o fato de as manifestações clínicas da doença só ocorrerem quando a anemia é grave e dependem da virulência de cada cepa (Ajayi *et al.*, 1978; Losos, 1986; Richey, 1993; Wanduragala e Ristic, 1993; Radostits *et al.*, 2002).

Foi observada a existência de correlação negativa entre o valor do hematócrito e as pontuações de exame físico, indicando maior comprometimento geral com a redução do hematócrito.

A correlação entre o hematócrito e a coloração das mucosas foi negativa, mas muito baixa, demonstrando que a avaliação deste parâmetro não é um bom indicador do grau de anemia. Este fato se deve às diferenças na amplitude de variação dos parâmetros analisados. O hematócrito é um exame preciso da porcentagem de células vermelhas do sangue, estando sujeito a pequena influência de fatores externos, se processado corretamente. Já a avaliação da coloração das mucosas é um parâmetro altamente subjetivo, que pode variar de acordo com a experiência do examinador.

As alterações que ocorreram nos sinais clínicos podem ser observadas nos Gráficos 8 a 12 e a análise gráfica das correlações entre estes parâmetros, o hematócrito e a parasitemia nos Anexos 1 a 7.

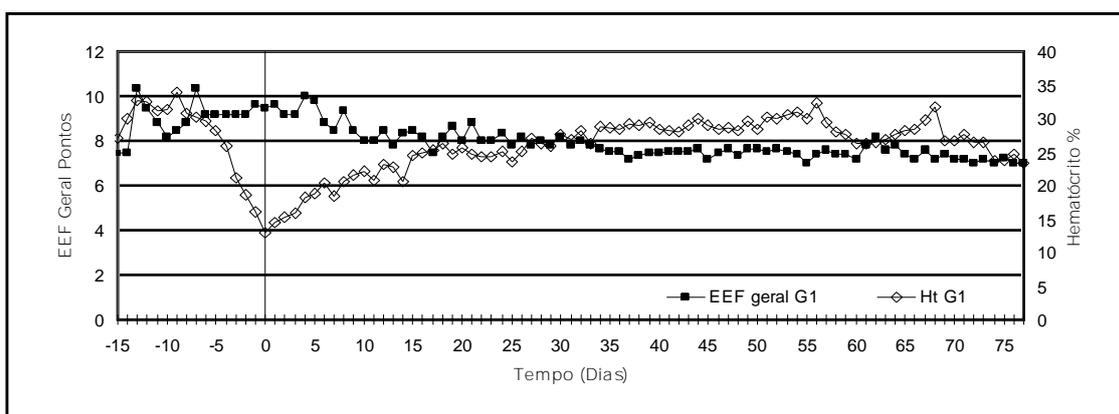


Gráfico 8 – Média do escore geral de exame físico (EEF Geral) e valores de hematócrito na anaplasiose induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros HPB (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

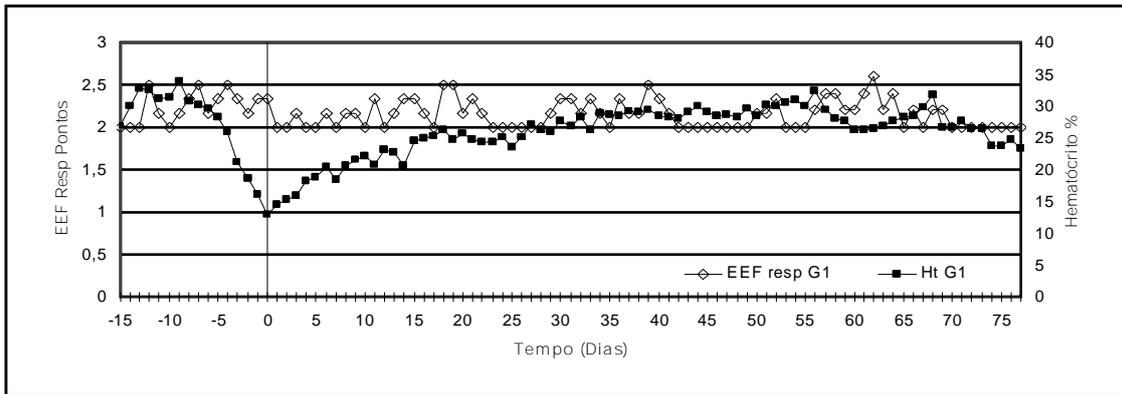


Gráfico 9 – Pontuação média de exame clínico do sistema respiratório (EEC Resp) e valores de hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros HPB (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

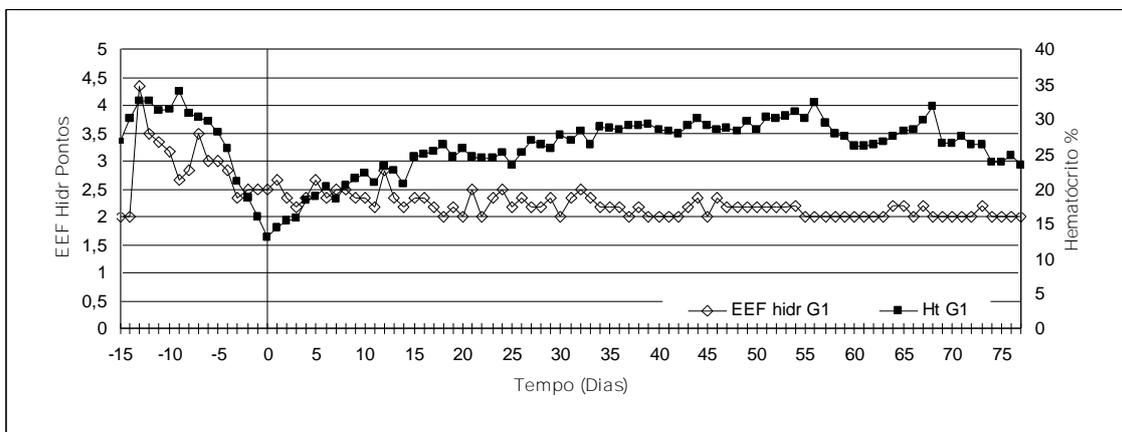


Gráfico 10 – Escore médio de exame clínico do grau de hidratação (EEC Hidr) e valores de hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros HPB (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

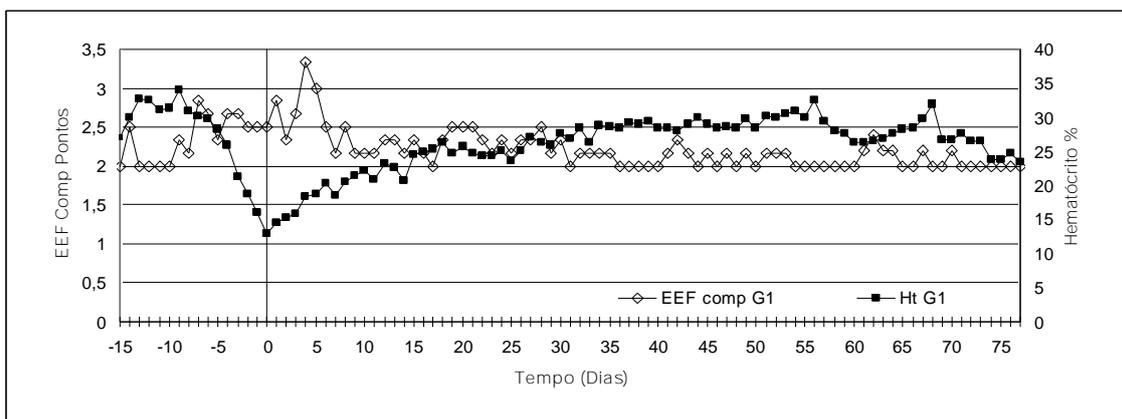


Gráfico 11 – Pontuação média do exame de comportamento (EEC Comp) e valores de hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros HPB (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

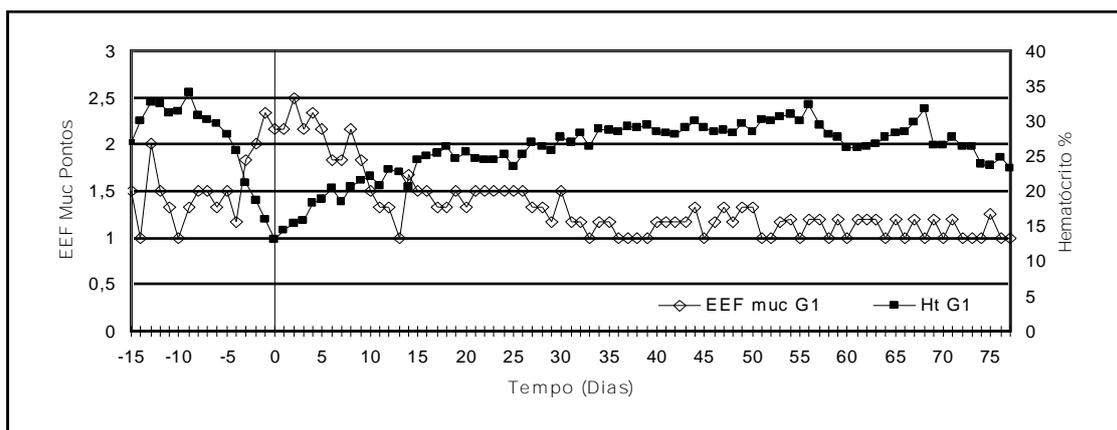


Gráfico 12 – Escore médio do exame de coloração de mucosas (EEC Muc) e valores de hematócrito na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros HPB (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

4.2. Experimento II

A inoculação com a cepa de *A. marginale* sem apêndice, em cinco bezerros de 110 a 120 dias, provocou o aparecimento de sinais clínicos acentuados em três animais e moderados em dois animais. Dos cinco animais, um morreu no dia 0, durante a coleta de amostras, e foi necropsiado em seguida. Outro animal apresentou um quadro clínico de pneumonia e foi descartado do experimento, a partir do momento do diagnóstico, realizado no dia 5. Um terceiro animal recebeu transfusão de quatro litros de sangue no dia 2 e foi mantido no experimento. Os outros animais se recuperaram naturalmente.

4.2.1. Hematócrito e Parasitemia

Os animais foram inoculados no dia 24 de agosto e, a partir do dia 06 de setembro, foram observadas as primeiras hemácias parasitadas nos esfregaços sangüíneos, caracterizando o período de incubação, que teve duração média de 13 dias. Durante o período de patência, que teve duração de 14 dias, observou-se um aumento significativo na parasitemia, atingindo seu valor máximo dois dias antes do pico de anemia. Seguiu-se uma rápida redução do número de hemácias parasitadas, retornando a menos de 1% no dia 4 e permanecendo abaixo deste valor até o final do experimento, caracterizando o início do período

convalescente, que durou cerca de 10 dias. O valor médio do pico de parasitemia foi de 11,86% variando entre 7 e 20%. O hematócrito mostrou redução gradual acompanhando o aumento da parasitemia e atingindo seu menor valor médio (10%) no dia 0 (26º dia após a inoculação), variando entre 9 e 12%. A partir do dia 1 houve um aumento gradual do hematócrito até o final do experimento (dia 14) demonstrando uma recuperação da anemia.

Estes achados condizem com os resultados encontrados por Ajayi *et al.* (1978) e descritos por diversos autores, com o pico de parasitemia podendo ultrapassar os 50% de células parasitadas, ocorrendo entre um e seis dias antes do pico da anemia, quando o valor do hematócrito pode atingir até 7% (Losos, 1986; Richey, 1993; Wanduragala e Ristic, 1993; Radostits *et al.*, 2002).

Os testes realizados demonstraram, novamente, a existência de correlação negativa entre os valores de parasitemia e de hematócrito, concordando com relatos de diversos autores (Ajayi *et al.*, 1978; Losos, 1986, Wanduragala e Ristic, 1993). A análise gráfica das correlações entre o hematócrito e a parasitemia, podem ser observadas no Anexo 8.

O comportamento destes parâmetros durante o Experimento II pode ser acompanhado no Gráfico 13.

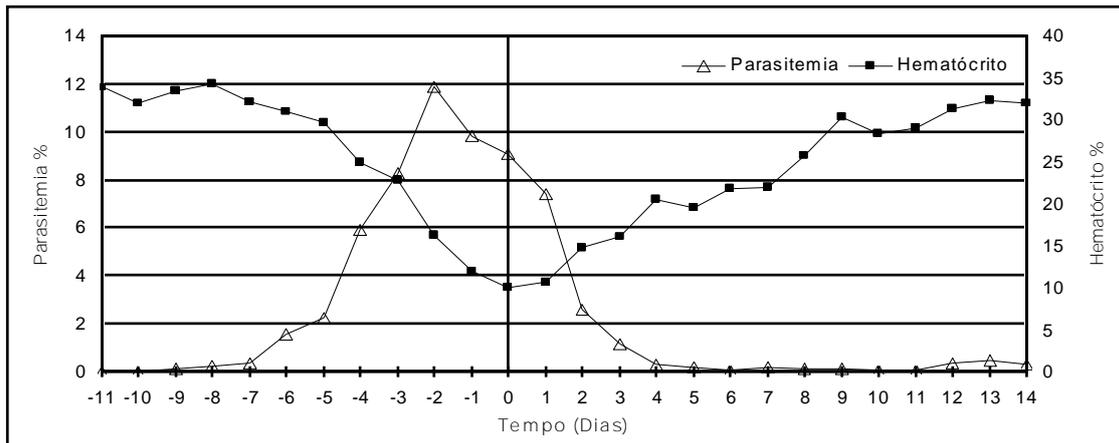


Gráfico 13 - Comportamento dos valores médios da parasitemia e do hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 110 a 120 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

4.2.2. Exames Físicos

4.2.2.1. Parâmetros Vitais

Na análise dos parâmetros vitais TR, FC e FR, verificou-se aumento da temperatura retal acima dos níveis fisiológicos nos cinco bezerros inoculados com a cepa de *A. marginale* sem apêndice. Este aumento foi observado entre os dias -3 e -1, coincidindo com o pico de parasitemia e atingiu seu maior valor no dia -1, com média de 40,84 °C, variando entre 40,3 e 41,2 °C. Com a redução do número de hemácias parasitadas, a temperatura não apresentou variação acima dos valores fisiológicos. Foi observado um aumento considerável na frequência cardíaca, ultrapassando os 120 BC/min entre os dias -3 e 2 e mantendo-se acima dos valores normais para bezerros (acima de 90 BC/min) durante toda a fase de patência da doença. A frequência respiratória elevou-se acima dos níveis fisiológicos (mais de 40 MR/min) entre os dias -5 e 5, coincidindo com o período de evolução e recuperação da anemia.

A febre é descrita como sinal clínico da anaplasnose, principalmente durante o período de aumento da parasitemia, embora não ocorra em todos os casos. O aumento da FC e da FR em resposta à anemia, são relatados por diversos autores como sinais clínicos frequentes da doença (Losos, 1986; Richey, 1993; Wanduragala e Ristic, 1993; Radostits *et al.*, 2002).

Os testes realizados no Experimento II demonstraram a existência de correlação negativa entre os valores de hematócrito e parasitemia, como descrito por Ajavi *et al.* (1978) e Losos (1986), e com as frequências cardíaca e respiratória indicando que, à medida que o hematócrito cai, aumenta o número de movimentos respiratórios e de batimentos cardíacos. Foi observada a existência de correlação positiva entre a temperatura retal e a parasitemia, como no Experimento I (Anexo 16).

O comportamento da TR, FC e FR durante o período de patência da anaplasnose no Experimento II estão ilustrados nos Gráficos 14 a 17.

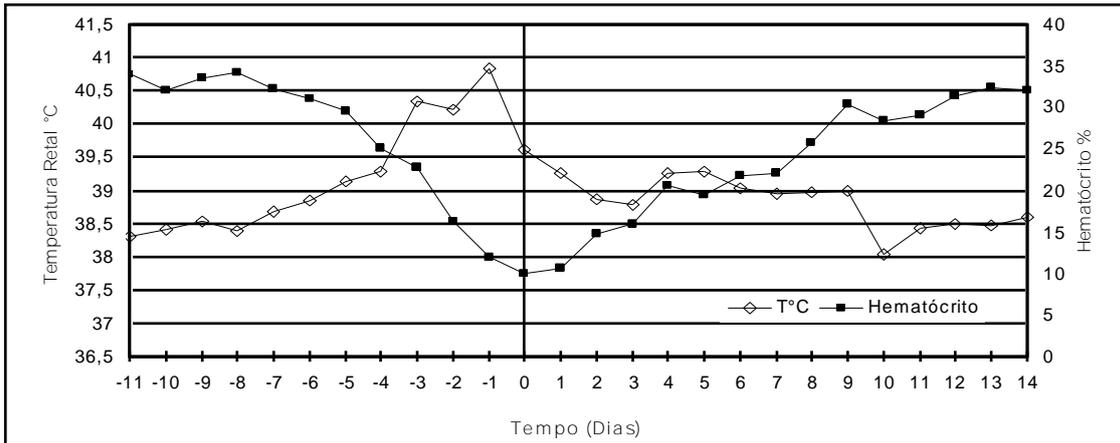


Gráfico 14 - Comportamento dos valores médios da temperatura retal e do hematócrito na anaplasmosse, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 110 a 120 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

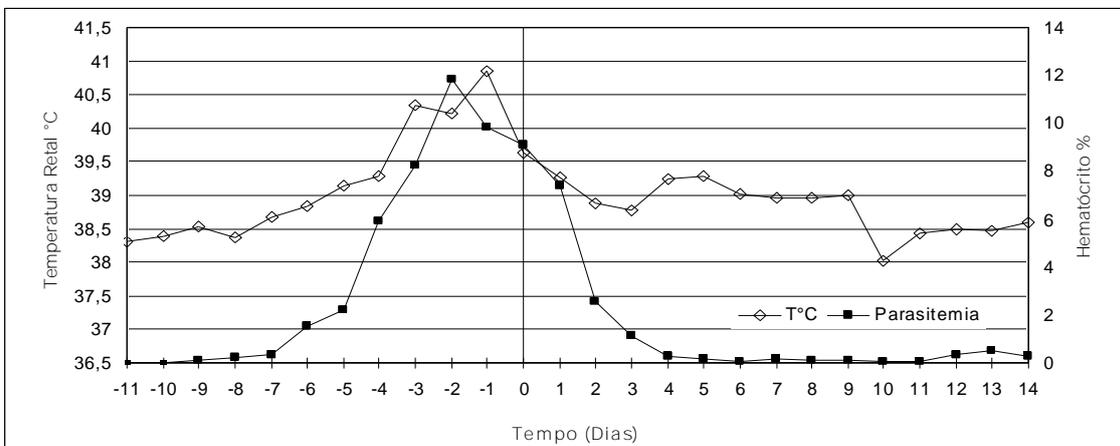


Gráfico 15 - Comportamento dos valores médios da parasitemia e da temperatura retal na anaplasmosse, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

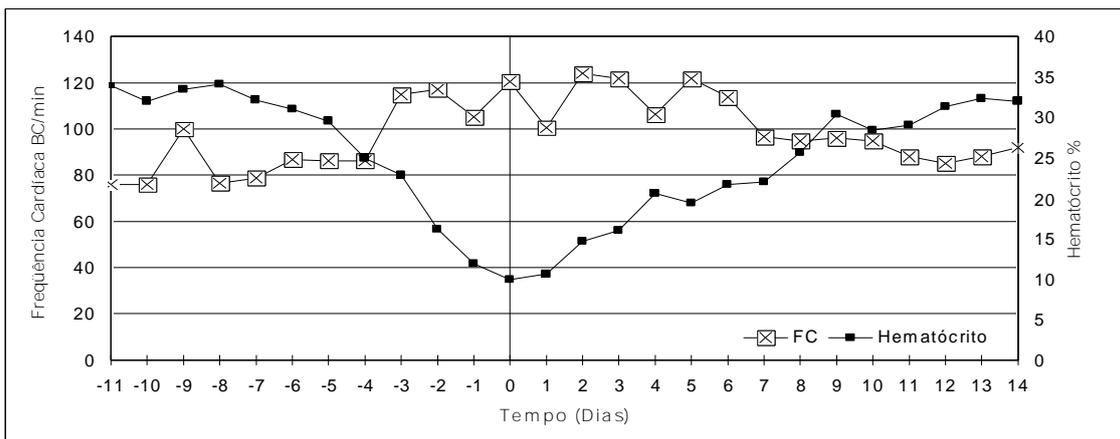


Gráfico 16 - Comportamento dos valores médios da frequência cardíaca e do hematócrito na anaplasmosse, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

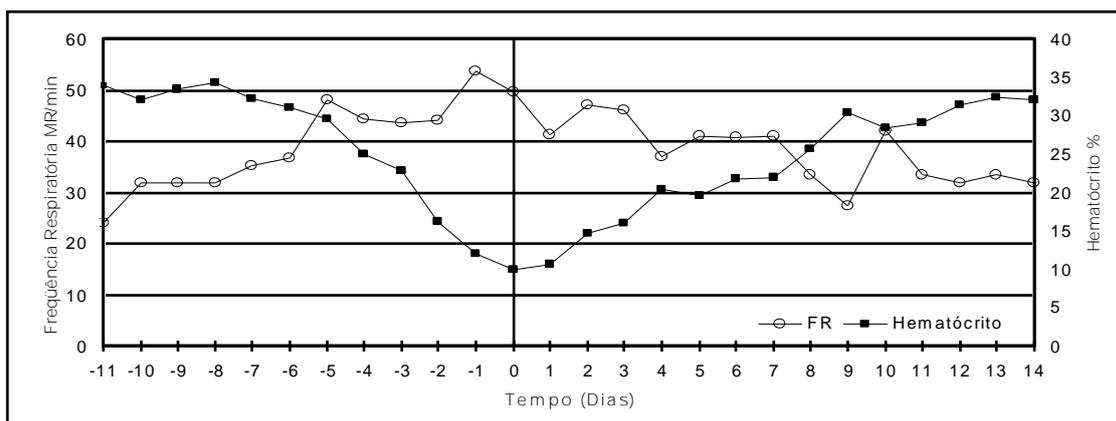


Gráfico 17 - Comportamento dos valores médios da frequência respiratória e do hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

4.2.2.2. Escore de Exame Físico (EEF)

Os principais sinais clínicos apresentados pelos bezerros com anaplasnose, além das alterações dos parâmetros vitais descritas anteriormente, foram: apatia e desidratação moderada, redução acentuada do apetite, respiração abdominal, dispnéia e mucosas pálidas ou ictéricas. As alterações foram mais intensas no dia 0 resultando em maiores valores no escore de exame físico geral (EEF geral).

Na análise dos parâmetros clínicos durante o período de patência, observou-se grande aumento nos valores dos escores de exame físico geral, de comportamento, de coloração de mucosas, do grau de hidratação e do sistema respiratório, atingindo faixas de pontuação consideradas graves (três animais) e moderada (dois animais) (Tabela 2). Entre os dias -7 a 9, ocorreu um aumento significativo em todos os parâmetros avaliados, atingindo suas pontuações máximas no dia 0, coincidindo exatamente com o pico da anemia, exceto no exame do sistema respiratório, o qual atingiu seu valor máximo no dia 2. Entre os dias -1 a 3, período de maior grau de anemia, os animais apresentaram apatia, redução ou ausência de apetite, mucosas pálidas em quatro animais e ictéricas em um, alterações respiratórias, principalmente dispnéia e respiração abdominal além de desidratação leve a moderada.

O aumento nos valores do EEF Geral foi ocasionado pela intensidade dos sinais

clínicos, apresentando elevações em todos os parâmetros. Os animais apresentaram apatia, redução total ou parcial do apetite, dispnéia e respiração abdominal, elevando os EEF de comportamento e respiratório. A ocorrência de desidratação moderada em grande parte dos animais, responsável pelo aumento no EEF de hidratação, está relacionada com as alterações de comportamento, com possível redução da ingestão de água e com o aumento da excreção urinária devido à febre. Outro fator que pode ter contribuído para a desidratação, foi a perda de água pela respiração, uma vez que ocorreu taquipnéia. Estes achados são descritos em diversos trabalhos como sinais clínicos comumente observados na anaplasnose e estão diretamente ligados ao grau de anemia provocado pela doença (Ajayi *et al.* 1978; Losos, 1986; Richey, 1993; Wanduragala e Ristic, 1993; Radostits *et al.* 2002).

Foi demonstrada a existência de correlação negativa entre o valor do hematócrito e as pontuações do exame físico geral, de comportamento, de coloração de mucosas e do grau de hidratação, de forma que, com a queda do número de hemácias, ocorrem paralelamente um aumento proporcional na pontuação dos exames clínicos.

As alterações que ocorreram nos escores de exame físico podem ser observadas nos gráficos 18 a 22 e a análise das correlações entre estes escores e o hematócrito podem ser observadas nos Anexos 8 a 16.

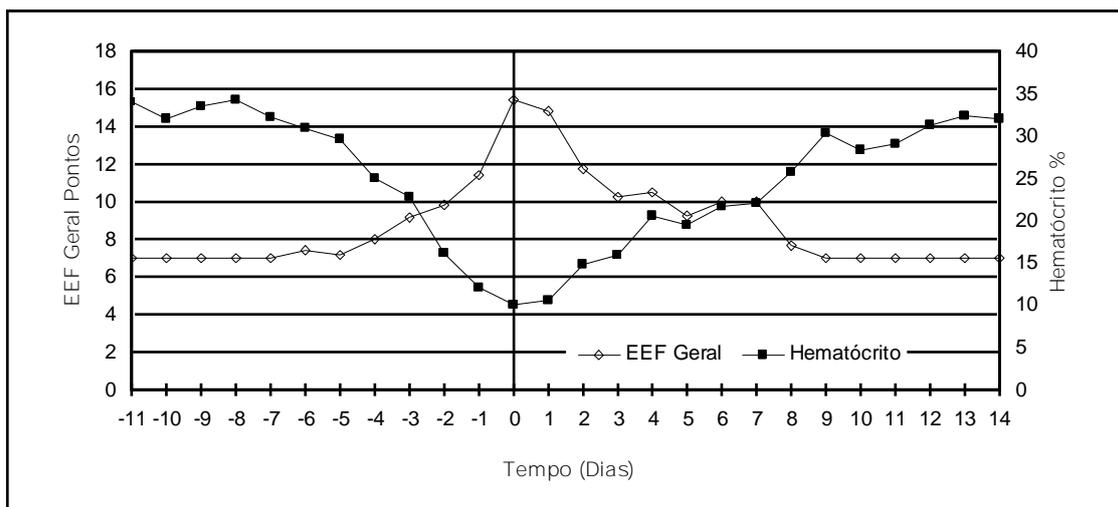


Gráfico 18 – Escore médio do exame físico geral (EEF Geral) e valores de hematócrito na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerras HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

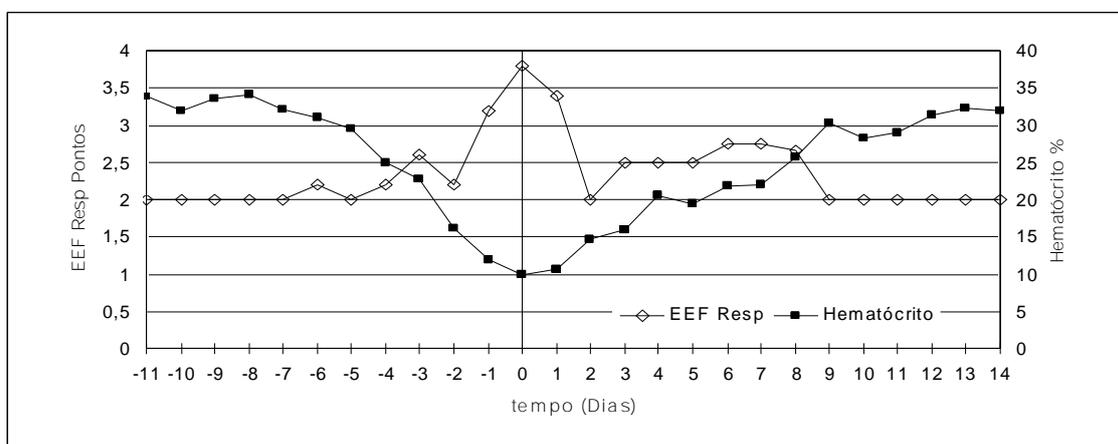


Gráfico 19 – Escore médio do exame do sistema respiratório (EEC Resp) e valores de hematócrito na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerras HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

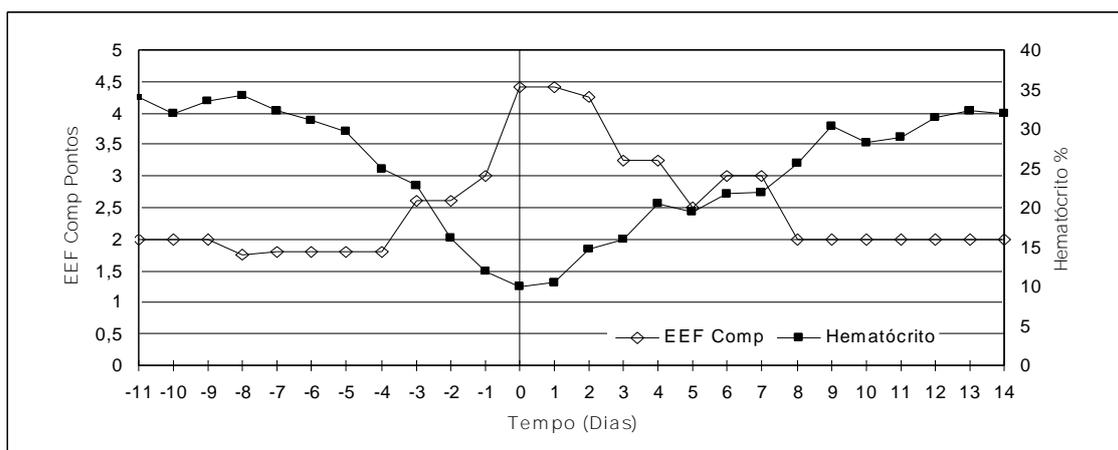


Gráfico 20 – Escore médio do exame de comportamento (EEF Comp) e valores de hematócrito na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerras HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

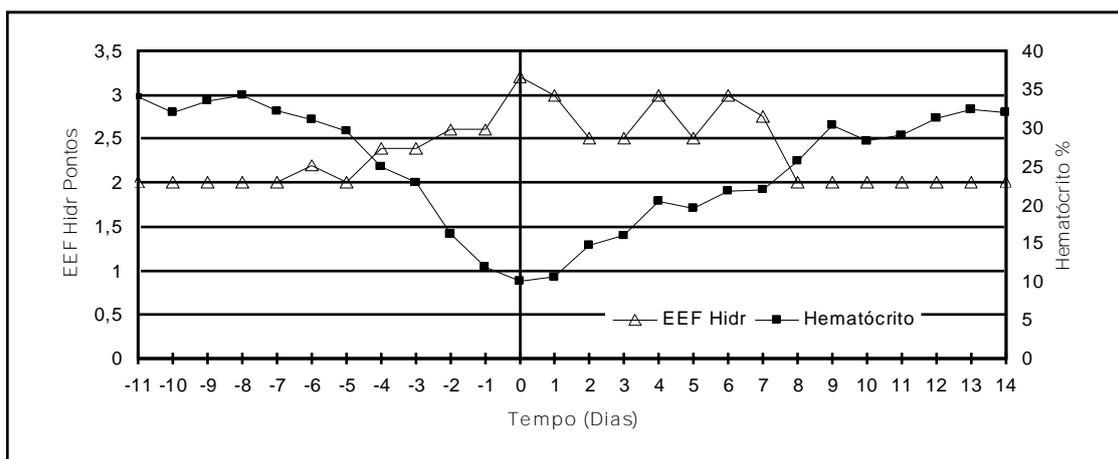


Gráfico 21 – Escore médio do grau desidratação (EEC Hidr) e valores de hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

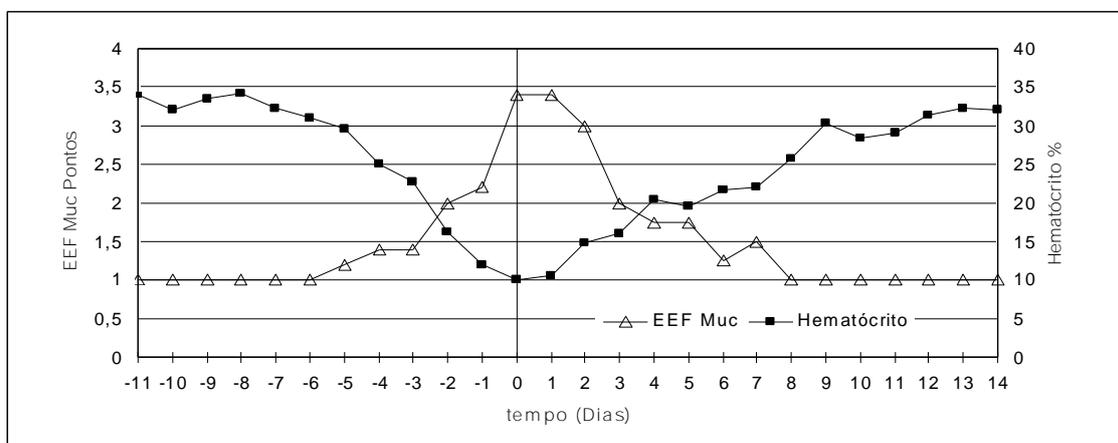


Gráfico 22 – Escore médio de coloração de mucosas (EEC Muc) e valores de hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

4.2.3. Equilíbrio Eletrolítico

Observou-se uma queda significativa nas concentrações de Na^+ e Cl^- , paralela à queda do hematócrito, embora os valores médios não tenham ultrapassado os limites fisiológicos. Os valores mínimos foram atingidos no dia 0, coincidindo exatamente com o pico de anemia, indicando a existência de uma correlação positiva entre estes parâmetros. A concentração média de Na^+ no dia 0 foi de 133,6 mmol/L e variou entre 131 a 136, enquanto a de Cl^- foi de 98 mmol/L, variando entre 95 a 101. Com a recuperação da anemia suas concentrações aumentaram gradualmente. Os níveis séricos de K^+ apresentaram uma pequena variação e oscilaram constantemente durante o experimento, ficando um pouco

abaixo dos níveis fisiológicos no dia 2 e entre os dias 4 a 7, apenas em dois animais.

Há poucos relatos na literatura sobre as alterações eletrolíticas e ácido-básicas na anaplasnose. Allen e Kutler (1981), estudando estes parâmetros durante a fase de patência da doença, em bezerros esplenectomizados, associaram à mortalidade à redução acentuada dos níveis de K^+ , à não compensação da acidose metabólica e ao atraso na resposta eritrogênica da medula óssea, que serão discutidos posteriormente.

O animal que morreu durante o experimento, contrariando os resultados de Allen e Kutler (1981), que verificaram redução dos níveis de K^+ plasmático nos casos fatais, apresentou aumento dos níveis

séricos deste íon, atingindo sua maior concentração, 5,8 mmol/L, no dia da sua morte (dia 1). O aumento dos níveis de K^+ é uma resposta fisiológica à acidose metabólica (Tietz *et al.*, 1994). A saída de

K^+ do LIC para o LEC força a entrada do H^+ nas células, ajudando a compensar a acidose. As alterações na concentração de Na^+ , Cl^- e K^+ podem ser acompanhadas nos gráficos 23 a 25.

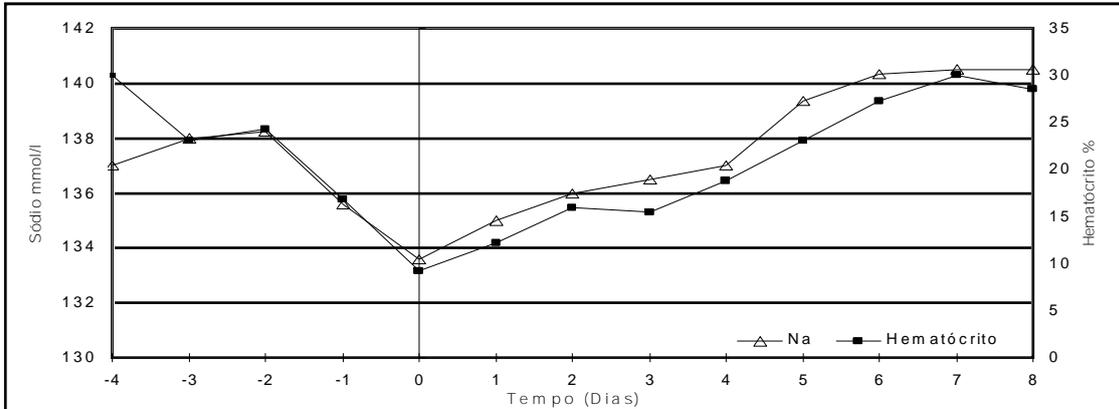


Gráfico 23 – Concentração média de Na^+ e valores de hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo horizonte, 2006.

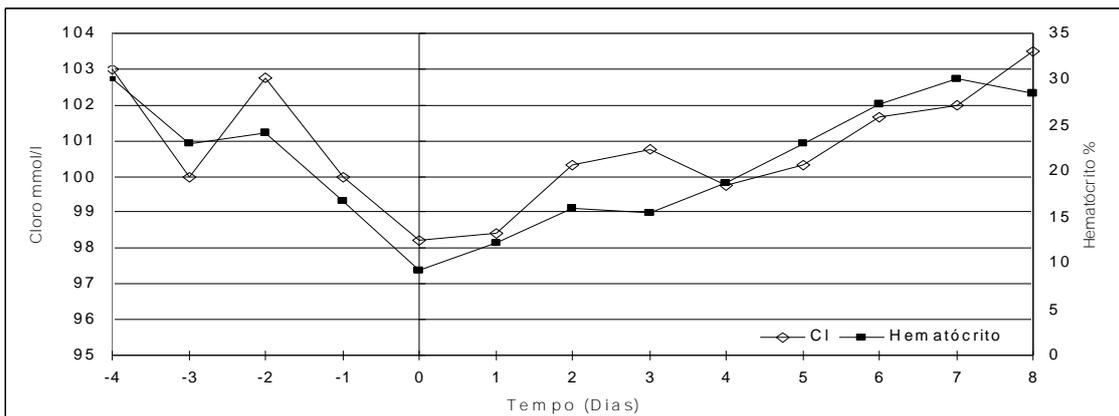


Gráfico 24 – Concentração média de Cl^- e valores de hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo horizonte, 2006.

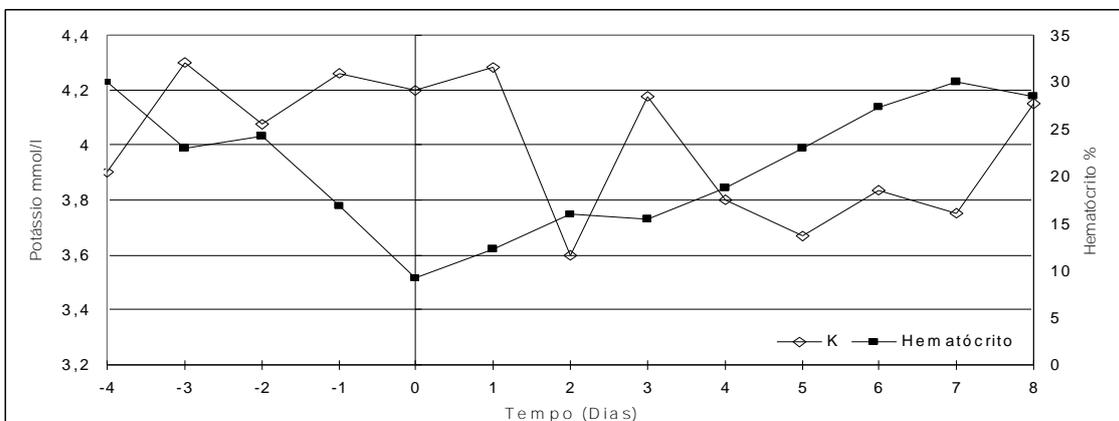


Gráfico 25 – Concentração média de K^+ e valores de hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo horizonte, 2006.

As análises de correlação entre o hematócrito e as concentrações de Na^+ , Cl^- e K^+ , confirmaram a existência de correlação positiva entre o hematócrito e os níveis séricos de Na^+ e Cl^- , permitindo o delineamento de curvas de regressão e, assim, a formulação de duas equações, com respectivamente 70% e 67% de precisão, para a predição das concentrações desses

íons a partir do valor do hematócrito. Não foi encontrada correlação significativa entre o hematócrito e as concentrações de K^+ .

As curvas de regressão linear e os prováveis valores de Na^+ e Cl^- , calculados a partir do valor do hematócrito, podem ser observados nos gráficos 26 e 27 e na Tabela 3, respectivamente.

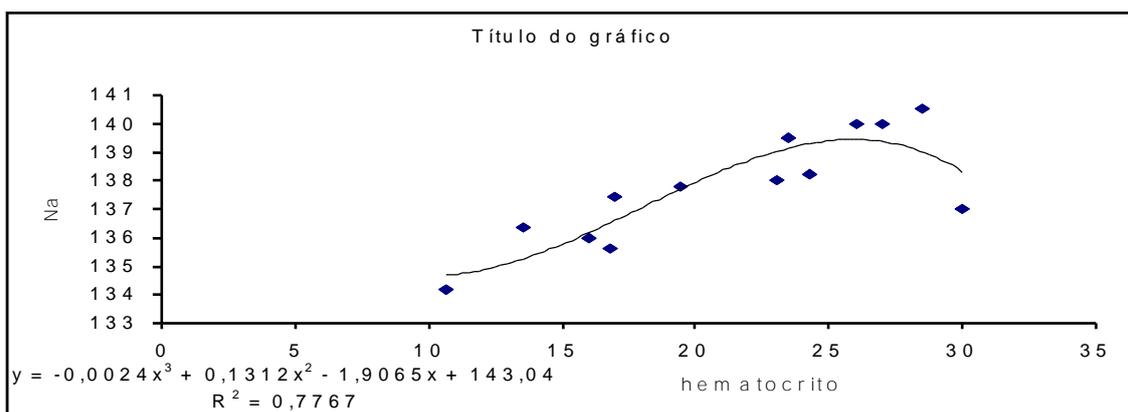


Gráfico 26 – Análise de regressão entre hematócrito e as concentrações séricas de Na^+ na anaplasmosse, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo horizonte, 2006.

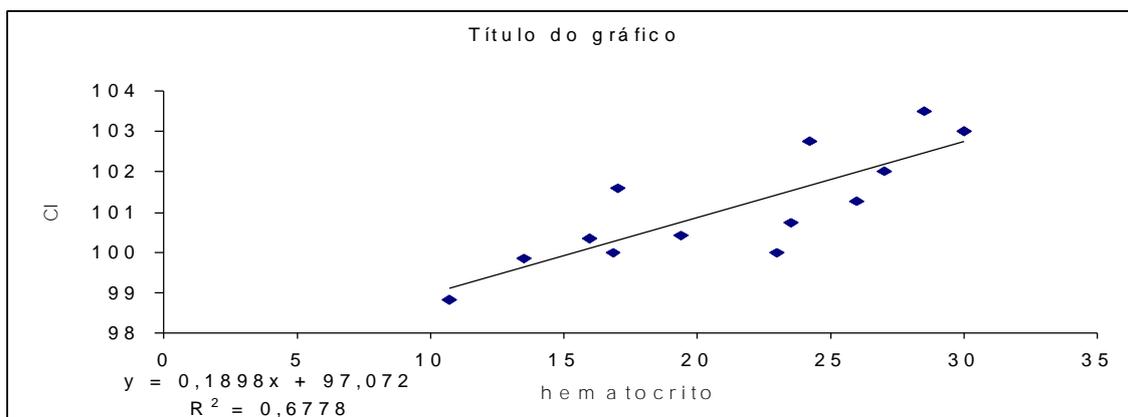


Gráfico 27 – Análise de regressão entre hematócrito e as concentrações séricas de Cl^- na anaplasmosse, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo horizonte, 2006.

4.2.4. Equilíbrio Ácido-Básico

Considerando que a faixa de variação fisiológica do pH sanguíneo de bovinos está entre 7,31 e 7,41, verificou-se a ocorrência de acidose metabólica totalmente compensada em quatro dos cinco animais. Ocorreu acidose metabólica não compensada apenas no bezerro que veio a óbito, atingindo valores mais baixos nos

dias 0 e 1, quando morreu (7,261 e 7,165 respectivamente).

Nos outros animais o pH médio manteve-se elevado, indicando a ocorrência de alcalose entre os dias -4 e -1 variando entre 7,43 e 7,51. Após o dia -1 houve uma pequena redução do pH sanguíneo que atingiu seu menor valor médio, 7,38 no primeiro dia após o pico de anemia (dia 1), mantendo-se em torno de 7,40 até o final do experimento. Estes resultados são

semelhantes aos encontrados por Allen e Kutler (1981), que observaram aumento no pH sanguíneo de bezerros com anemia provocada pela inoculação de *Anaplasma marginale*, mas que se recuperaram da infecção. Neste mesmo trabalho

observaram que, somente nos casos fatais o pH se tornava ácido, indicando uma não compensação da acidose metabólica. O comportamento do pH sanguíneo durante a evolução da doença pode ser observado no Gráfico 28.

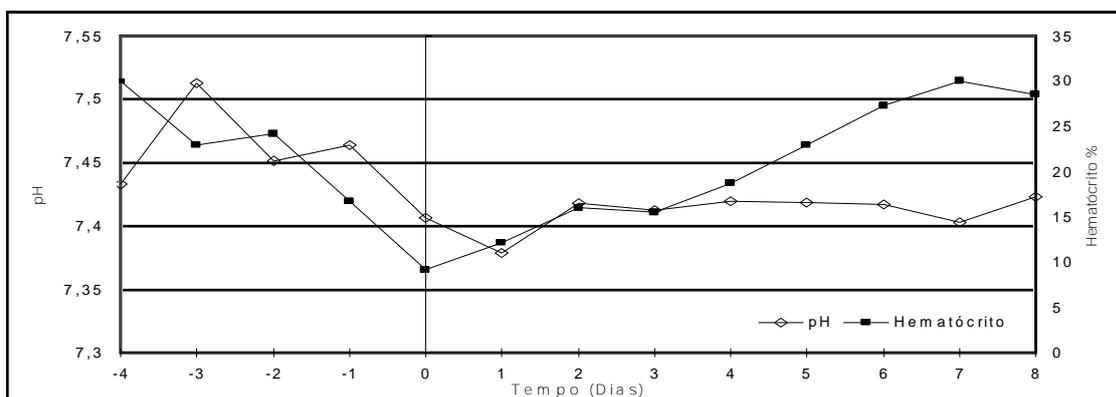


Gráfico 28 – Valores médios do pH e do hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

A pCO_2 apresentou uma redução discreta a partir do dia -2, atingindo seu menor valor de 31,8 mmHg no dia 0 e variou entre 27,6 e 34,9 mmHg e aumentando gradualmente até o final do experimento. A maior redução na pCO_2 foi observada no dia 0, no bezerro que morreu. Os outros cinco animais apresentaram redução deste parâmetro, mas dentro dos limites fisiológicos. Este

comportamento pode ser explicado pelo aumento da frequência respiratória durante o período patente. A redução do pH sanguíneo estimula uma hiperventilação, resultando em redução da pCO_2 , para manutenção do equilíbrio ácido-básico (Tietz *et al.* 1994). O comportamento da pCO_2 durante a evolução da doença pode ser observado no Gráfico 29.

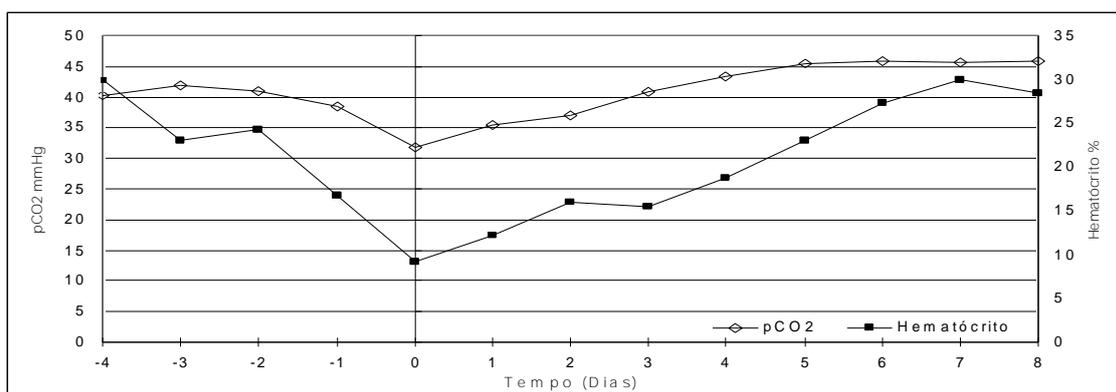


Gráfico 29 – Valores médios da pCO_2 e do hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

A concentração de HCO_3^- , apresentou uma redução concomitante à redução do hematócrito, atingindo seu menor valor médio (20,52 mmol/L) no dia 0 e variou entre 12,4 e 24 mmol/L. Após o pico de anemia, ocorreu um aumento gradual da concentração de HCO_3^- , retornando aos níveis fisiológicos no dia 4. O bezerro que morreu apresentou concentrações muito baixas de HCO_3^- nos dois últimos dias de vida (respectivamente, 12,4 e 8,5 mmol/L).

Resultados semelhantes foram encontrados por Allen e Kutler (1981) em bezerros esplenectomizados com anaplasiose induzida. A redução do HCO_3^- é esperada em casos de acidose, pois ele é o principal tampão do meio extracelular (Tietz *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1995). O comportamento do HCO_3^- sanguíneo durante a evolução da doença pode ser observado no Gráfico 30.

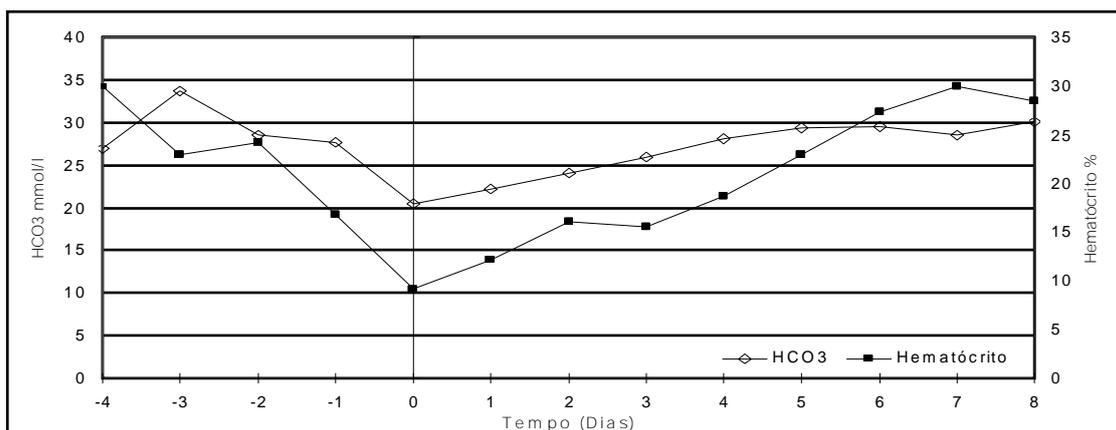


Gráfico 30 – Concentração média de HCO_3^- e valores do hematócrito na anaplasiose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

As análises de regressão entre o hematócrito e as concentrações de HCO_3^- confirmaram a existência de correlação positiva entre estes parâmetros, permitindo o delineamento de uma curva e a formulação de uma equação (Gráfico 31), com 70% de precisão para a predição das

concentrações de HCO_3^- , a partir do valor do hematócrito. A curva de regressão linear e os prováveis valores de bicarbonato, calculados a partir do valor do hematócrito são apresentados no Gráfico 31 e na Tabela 3, respectivamente.

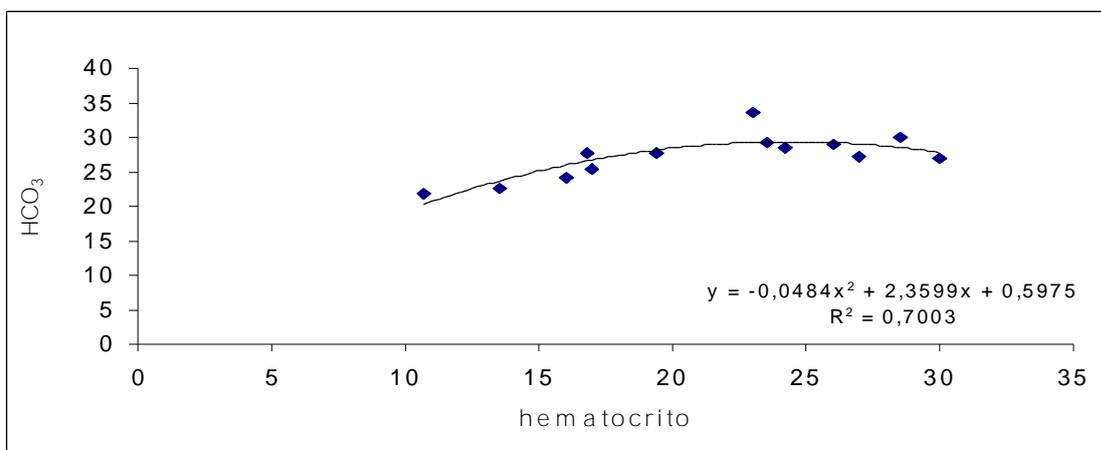


Gráfico 31 – Análise de regressão entre hematócrito e as concentrações séricas de HCO_3^- , na anaplasiose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo horizonte, 2006.

Tabela 3 – Cálculo das concentrações séricas de Na⁺, Cl⁻ e HCO₃⁻ a partir do valor do hematócrito na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo horizonte, 2006.

Hematócrito %	Na mmol/l	Cl mmol/l	HCO ₃ mmol/l
25	139	101	29
24	139	101	29
23	139	101	29
22	139	101	29
21	138	101	28
20	138	100	28
19	137	100	27
18	137	100	27
17	136	100	26
16	136	100	25
15	135	99	25
14	135	99	24
13	135	99	23
12	134	99	21
11	134	99	20
10	134	98	19
9	134	98	17
8	134	98	16
7	135	98	14

O maior valor médio da diferença aniônica, de 19,2, foi observado no dia 0 e variou entre 12 e 17. O menor valor médio do excesso de bases, igual a -4,2, foi observado no dia 0 variando entre -15 e 0. Os maiores valores da diferença aniônica e os menores valores do excesso de bases foram observados no bezerro que morreu (AG=27, BE=-15). Dos demais, somente um animal apresentou alterações significativas nestes parâmetros (AG=22, BE=-5) e os restantes apresentaram aumento da AG e redução do BE, mas dentro dos limites fisiológicos. Segundo Jain (1986), o aumento da diferença aniônica acima de 18 e um valor negativo no excesso de bases, são indicativos de acidose metabólica e, quanto maior a diferença, maior o grau de acidose. A redução significativa nas concentrações de HCO₃⁻ e Cl⁻, principais ânions extracelulares, mesmo com a redução dos níveis de Na⁺, principal cátion do LEC, explica as alterações dos valores de AG e BE. Allen e Kutler (1981) observaram

resultados semelhantes em relação à AG e atribuíram o aumento da diferença aniônica à produção de grandes quantidades de ácido láctico, que pode ser observada nas anemias e é responsável pelo maior consumo do tampão HCO₃⁻. A produção de ácido láctico é causada pela grave hipóxia tecidual, secundária à anemia grave e provavelmente foi responsável pelo alto valor de AG no animal que morreu, caracterizando uma acidose metabólica não compensada, uma vez que o pH sanguíneo foi de 7,165, no dia de sua morte. Os outros animais apresentaram uma acidose metabólica por déficit de bicarbonato, porém, os valores elevados de pH e baixos de pCO₂ indicam a ocorrência de uma acidose metabólica totalmente compensada, mesmo no animal que apresentou valores ultrapassando os níveis fisiológicos (Tietz *et al.*, 1994). O comportamento da AG e do BE durante a evolução da doença pode ser observado nos Gráficos 32 e 33.

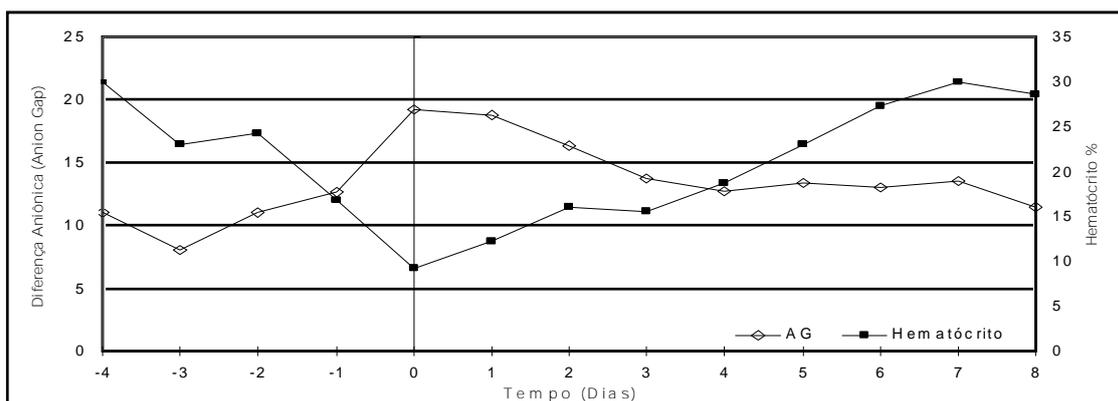


Gráfico 32 – Valores médios da diferença aniônica e do hematócrito na fase de patência da anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade.

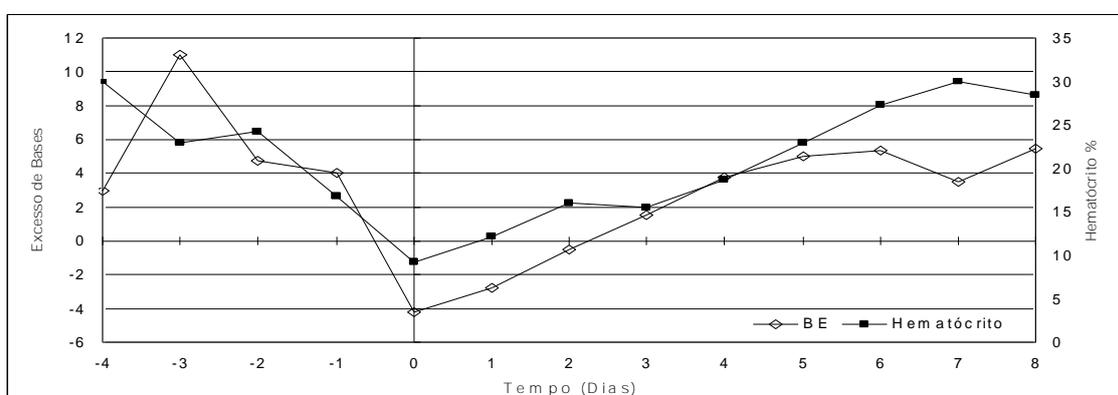


Gráfico 33 – Valores médios do excesso de bases e do hematócrito na fase de patência da anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade.

4.2.5. Hemogramas

A análise dos hemogramas demonstrou a ocorrência de uma anemia normocítica e normocrômica, que evoluiu para macrocítica e normocrômica em todos os animais acometidos. Foi observada uma queda acentuada na contagem de hemácias (RBC) e nos níveis séricos de hemoglobina, que atingiram seus menores valores no dia 2. Observou-se aumento na RDWc e no VCM, entre os dias 1 e 3, respectivamente, indicando a ocorrência de reticulocitose. Também foi observado aumento na CHCM e na CHM após o pico de queda do hematócrito indicando a recuperação da anemia. As contagens de leucócitos revelaram a ocorrência de leucocitose

devida principalmente à linfocitose e a um aumento discreto nas contagens de segmentados entre os dias 3 e 7 após o pico de anemia. Houve redução gradual nas contagens de plaquetas e a menor contagem foi observada no dia 0. A partir do dia 1 ocorreu uma recuperação rápida no número de plaquetas.

Os resultados encontrados no quadro hematológico da anaplasnose neste trabalho são semelhantes aos descritos por diversos autores (Losos, 1986; Sharma *et al.*, 1986; Wanduragala e Ristic, 1993; Richey 1993; Radostits *et al.*, 2002). As alterações observadas nos hemogramas dos animais estão esquematizadas nos gráficos 34 a 37.

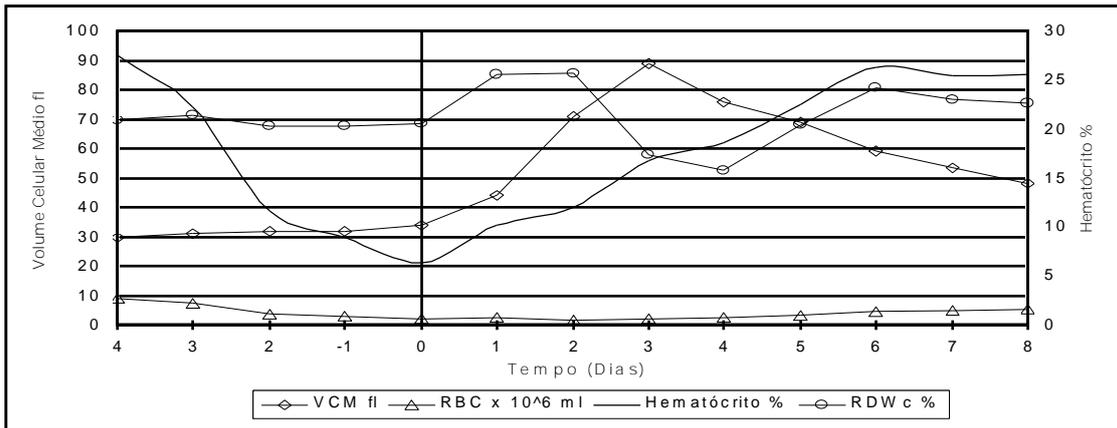


Gráfico 34 – Valores médios do RBC, VCM, RDWc e do hematócrito na anaplasmose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

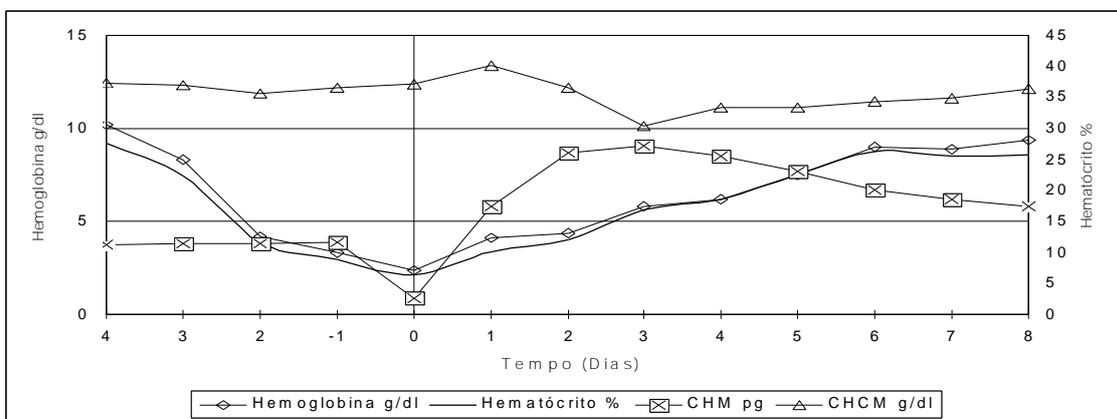


Gráfico 35 – Valores médios da CHCM, CHM, hemoglobina e do hematócrito na anaplasmose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

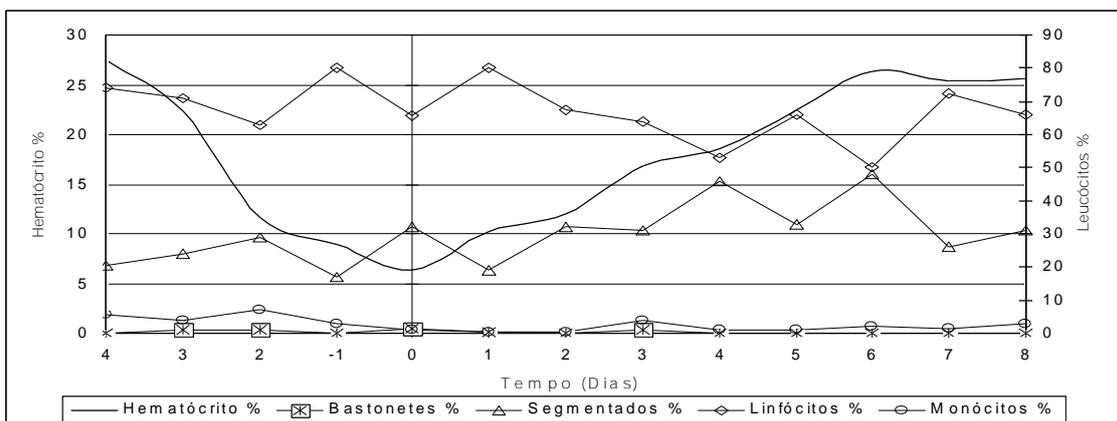


Gráfico 36 – Valores médios das contagens de leucócitos e do hematócrito na anaplasmose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

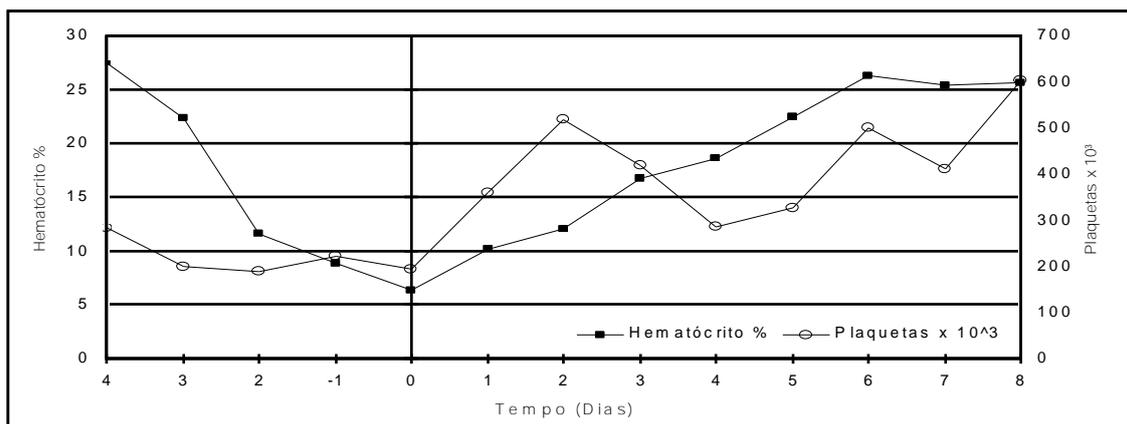


Gráfico 37 – Contagem de plaquetas e valores do hematócrito na anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

4.2.6. Parâmetros Bioquímicos

Paralelamente à queda do hematócrito, observou-se um aumento gradual na concentração de uréia nitrogenada (BUN), atingindo sua concentração máxima, de 23,3 mg/mL, no dia 0, variando entre 10 e 33 mg/mL. A mensuração dos níveis de glicose revelou queda nas suas concentrações paralela à redução do hematócrito, atingindo seu menor valor 54,67 mg/mL no dia 0, variando entre 18 e 76 mg/mL. Após o pico de anemia, as concentrações séricas de uréia e glicose retornaram rapidamente aos níveis fisiológicos.

As concentrações de proteínas plasmáticas apresentaram uma redução discreta no dia

-2 e atingiu seu menor valor médio (5 g/dL) no dia 1, contrariando as afirmações de Losos (1986), que cita a ocorrência de aumento das proteínas séricas totais (principalmente pelo aumento das globulinas) seguindo o pico de parasitemia e acompanhando a anemia, o que não foi observado neste experimento. Este achado pode estar relacionado à ocorrência de distúrbios hepáticos, que podem ocorrer durante a anaplasnose (Albitron e Seger, 1962), ou à utilização das proteínas como tampão sanguíneo, reduzindo suas concentrações séricas (Jain, 1986).

As alterações nas concentrações plasmáticas de uréia, glicose e proteínas podem ser observadas nos gráficos 38 a 40.

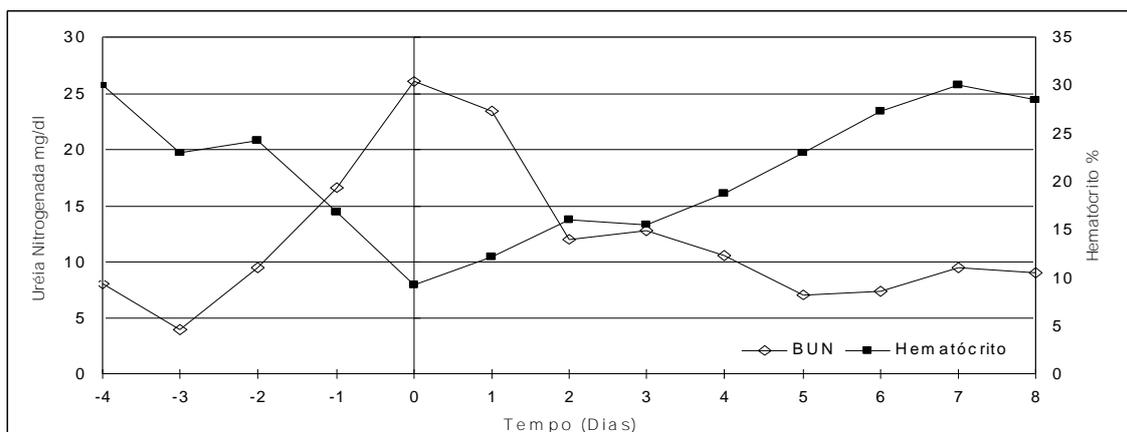


Gráfico 38 – Concentração sérica média de uréia nitrogenada e valores do hematócrito na fase de patência da anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade.

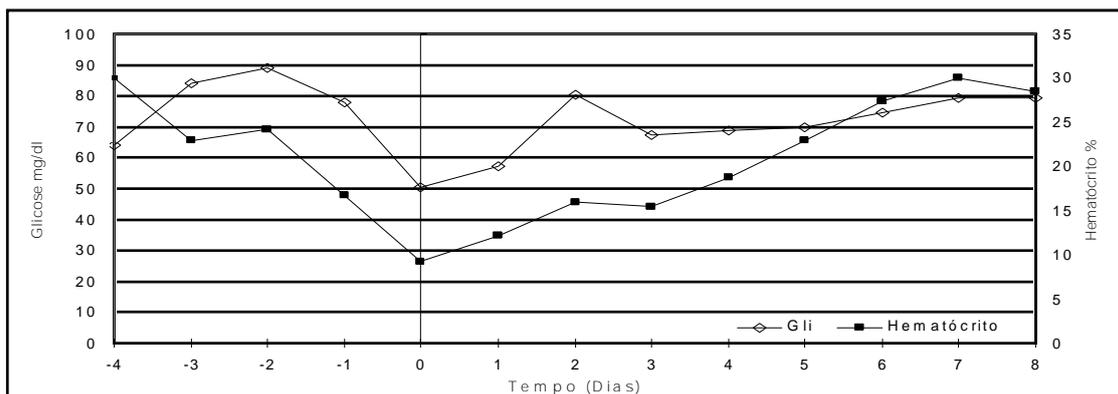


Gráfico 39 - Concentração média de glicose sanguínea e valores do hematócrito na fase de patência da anaplasmosse, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade.

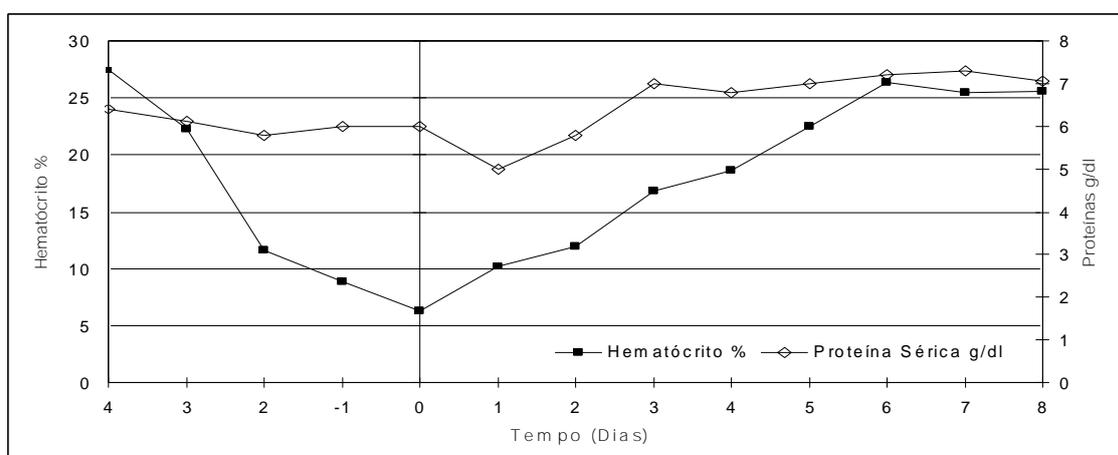


Gráfico 40 - Concentração média de proteínas plasmáticas e valores do hematócrito na fase de patência da anaplasmosse, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade.

Há relatos de aumento nas concentrações séricas de uréia durante a fase de patência da anaplasmosse. Um aumento acima de 150mg/mL é indicativo de insuficiência renal, porém os valores obtidos nesse trabalho, mesmo no animal que morreu, não se aproximaram deste patamar. Allen *et al.* (1981), relacionaram o aumento nas concentrações de uréia observado na fase de patência da doença ao metabolismo da hemoglobina, com a liberação de catabólitos da globina pelas células do sistema monocítico fagocitário, verificando e existência de uma forte correlação negativa entre as contagens de hemácias e as concentrações de uréia, concordando com os resultados obtidos neste experimento. A redução dos níveis de glicose pode ser explicada pela falta de suprimento energético adequado (Dirksen *et al.* 1993), uma vez que os animais acometidos apresentaram redução

significativa no apetite durante a fase de patência da doença e as concentrações de glicose nos bovinos variam muito, dependendo da ingestão de alimentos.

4.2.7. Urinálise

Os exames de urinálise revelaram alterações na: densidade, pH, bilirrubina e urobilinogênio, observadas em todos os animais. Não foi constatada a presença de hemácias, hemoglobina, glicose, corpos cetônicos, nitritos e leucócitos.

Observou-se uma variação constante da densidade da urina, que permaneceu entre os limites fisiológicos durante todo o período do experimento, exceto no dia -2, quando houve uma pequena redução do seu valor. O pH apresentou uma redução a partir do dia -3, mantendo-se abaixo dos níveis fisiológicos a partir do dia 0, atingindo seu menor valor no dia 3 e

permanecendo ácido até o final do experimento. Foi observado aumento na excreção de bilirrubina, urobilinogênio e proteínas. Os picos de concentração de bilirrubina e urobilinogênio foram

observados no dia 2, e o de proteínas no dia 4. As alterações observadas nos exames de urina podem ser observadas nos Gráficos 41 a 45.

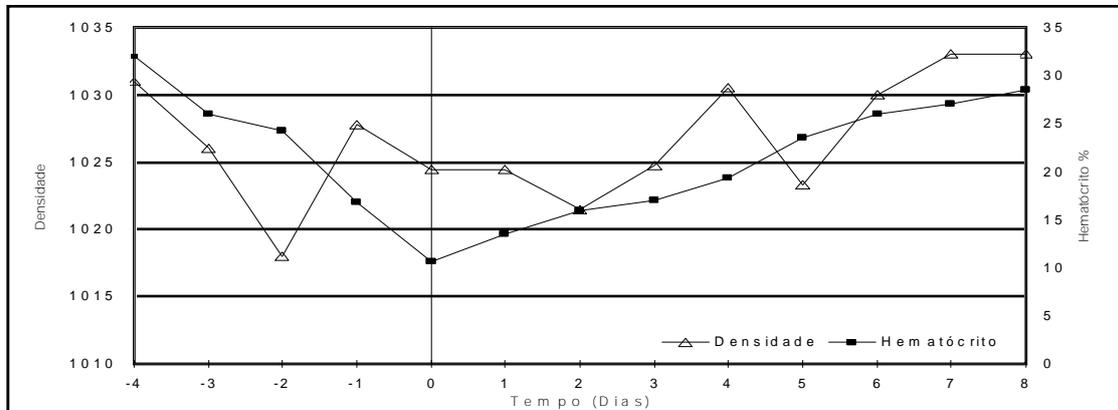


Gráfico 41 – Valores médios da densidade da urina e do hematócrito na fase de patência da anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade.

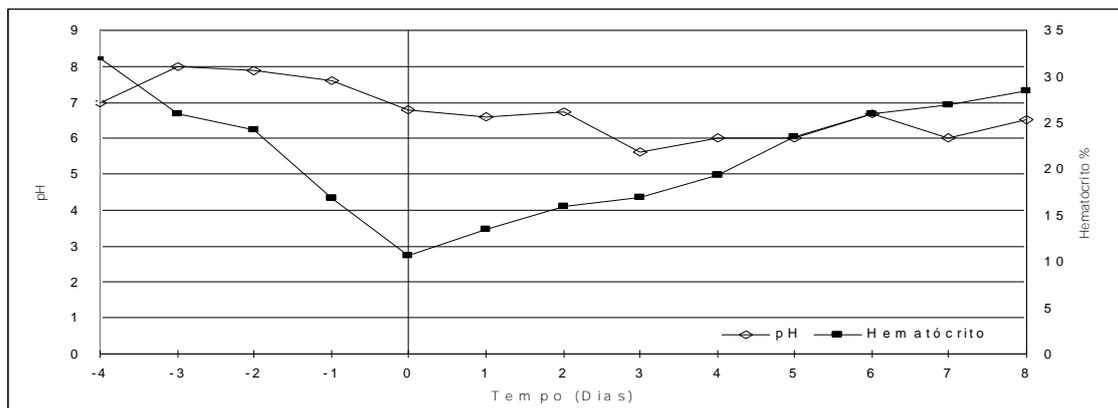


Gráfico 42 – Valores médios do pH urinário e do hematócrito na fase de patência da anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade.

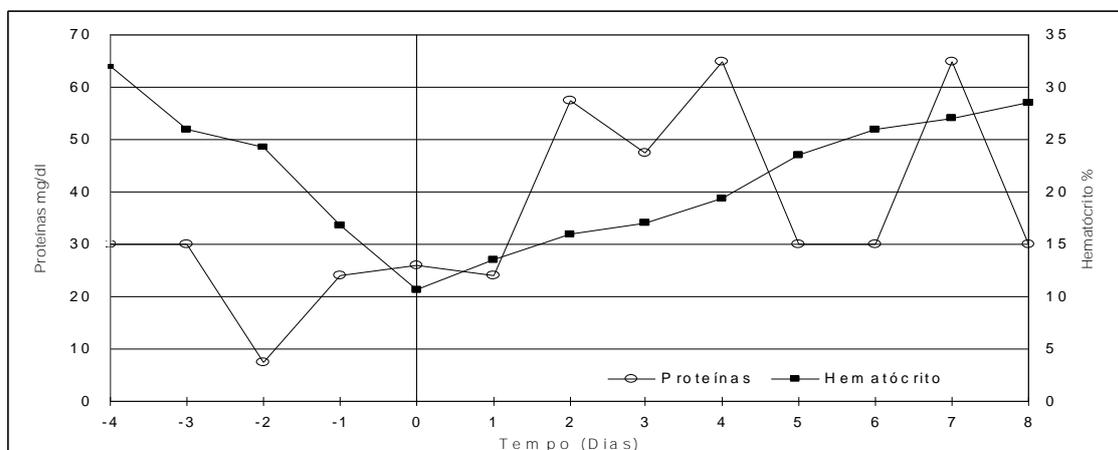


Gráfico 43 - Concentração média de proteínas na urina e valores do hematócrito na fase de patência da anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade.

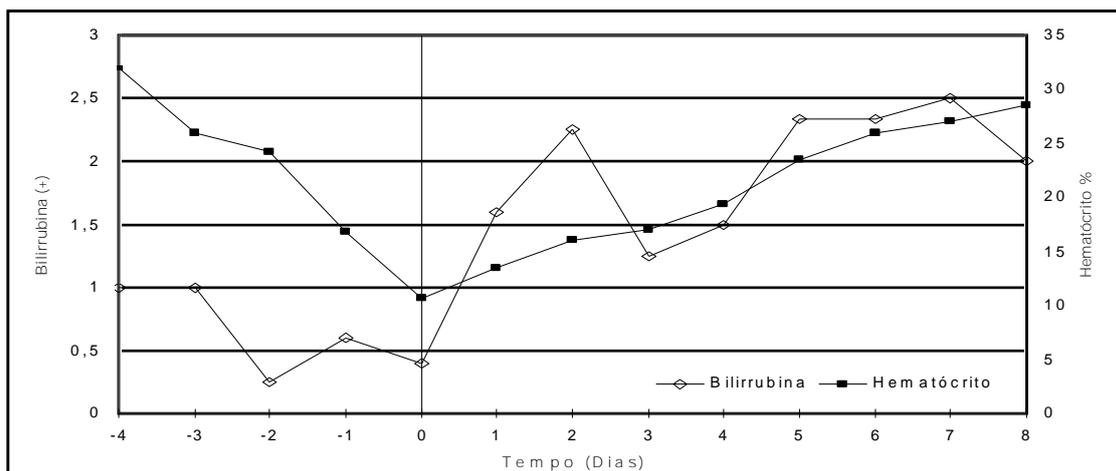


Gráfico 44 - Concentração urinária média de bilirrubina e valores do hematócrito na fase de patência da anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade.

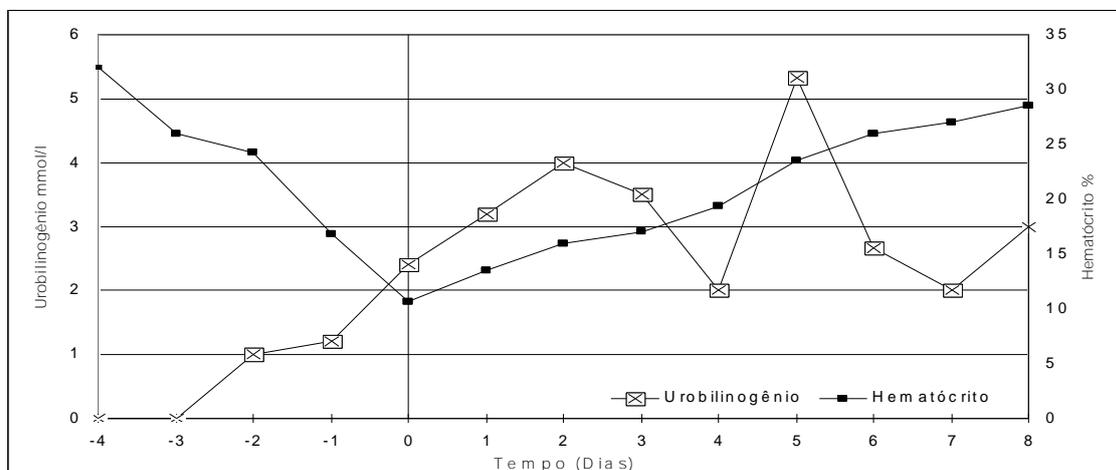


Gráfico 45 - Concentração urinária média de urobilinogênio e valores do hematócrito na fase de patência da anaplasnose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade.

Segundo Meyer *et al.* (1995) a excreção dos íons H^+ na urina faz parte da função renal na regulação do equilíbrio ácido-básico e é uma resposta fisiológica à acidose metabólica.

Meyer *et al.* (1995) também descrevem a ocorrência de leve proteinúria transitória após fadiga muscular, estresse e febre.

Allbritton e Seger (1962) relatam o aumento nas concentrações séricas e na excreção urinária de bilirrubina e urobilinogênio, durante a fase de patência da anaplasnose, com o pico de concentração destes pigmentos na urina, ocorrendo dois dias após o pico de anemia. Após a destruição das hemácias dentro das células do SMF a hemoglobina é

catabolizada, originando a hemobilirrubina que é liberada na corrente sanguínea. Ao atingir o fígado a hemobilirrubina é conjugada formando a coleobilirrubina, que é excretada na bile e lançada no intestino, onde é convertida em urobilinogênio. A maior parte do urobilinogênio é excretada nas fezes e uma pequena parte é reabsorvida e novamente excretada pelo fígado e pelos rins (Allbritton e Seger, 1962). A excreção de bilirrubina e urobilinogênio na urina, está diretamente relacionada ao aumento das concentrações séricas destes pigmentos (Meyer *et al.*, 1995).

A redução discreta da densidade da urina pode ser causada pela poliúria (Meyer *et al.*, 1995) que é relatada como um sinal

clínico da doença, embora não tenha sido avaliado o volume urinário (Losos, 1986; Ristic, 1993). A excreção de íons de hidrogênio na urina é fundamental para regulação do pH sanguíneo (Meyer *et al.*, 1995) e explica a redução do pH urinário observada durante a fase de patência da anaplasose, quando os animais apresentaram uma acidose metabólica. Também houve um aumento na excreção urinária de proteínas, em todos os animais a partir do dia 0, este aumento pode ser indicativo de uma lesão renal, uma vez que foi observado aumento discreto nas concentrações séricas de BUN (Meyer *et al.*, 1995). Foram observados aumentos na excreção de bilirrubina e urobilinogênio indicando aumento nos níveis séricos desses pigmentos, que são metabólitos da hemoglobina, sendo eliminados pelo fígado e excretados principalmente nas fezes, também podendo ser eliminados na urina. Não foi encontrada a presença de hemoglobina na urina o que é esperado na anaplasose uma vez que as hemácias são destruídas no interior das células do SMF não havendo hemólise e a conseqüente liberação de hemoglobina no espaço intravascular (Allbritton e Seger, 1962). Isso também explica a redução dos níveis séricos de hemoglobina observada em todos os animais.

4.2.8. Achados de necropsia

O animal que morreu durante o Experimento II foi necropsiado e os principais achados foram: icterícia generalizada, congestão hepática e esplênica, vesícula biliar distendida e caquexia. Estes achados coincidem com os de diversos autores (Losos, 1986; Wanduragala e Ristic, 1993; Richey, 1993; Radostits *et al.* 2002). Também foi encontrada uma área de aderência no lobo cranial do pulmão direito, com 10x3 cm, entre a pleura visceral e parietal, indicando a ocorrência de uma pneumonia, durante a fase de adaptação.

O aumento de volume observado no baço e no fígado do animal necropsiado pode estar relacionado ao aumento da atividade hematocitopoiética. Nestes locais ocorre uma pequena parte da produção e

principalmente a remoção dos eritrócitos e o metabolismo dos produtos originados da destruição das hemácias, principalmente da bilirrubina.

A intensa icterícia observada em toda a carcaça, a distensão da vesícula biliar, a evidênciação do padrão lobular e a coloração acastanhada do fígado e dos rins podem ser indicativas de lesão ou sobrecarga da função hepática e renal, o que teria causado o acúmulo da bilirrubina nos tecidos e pode ter contribuído significativamente para a morte do animal.

5. Considerações Finais

No campo o diagnóstico da anaplasose, na maioria das vezes, é realizado com base nos sintomas clínicos que, geralmente, só aparecem alguns dias após o pico de parasitemia, quando a anemia é grave. Além disso, os tratamentos usualmente realizados se baseiam no combate ao agente etiológico, não considerando as alterações decorrentes da anemia. Invariavelmente, quando os animais são tratados dessa forma, o número de células parasitadas é baixo e o tratamento com antibióticos não interfere na evolução da anemia. Estes fatores contribuem para baixa a eficiência no tratamento convencional e para as altas taxas de mortalidade observadas na anaplasose bovina.

Como pudemos observar nesse experimento, o curso da doença é longo, cerca de 90 dias, os sinais clínicos só aparecem quando a anemia é grave e o período de recuperação dura vários dias. Embora o período convalescente tenha durado cerca de 30 dias, diversos autores relatam que ele pode durar entre dois e três meses ou mais (Ristic, 1993; Wanduragala e Ristic, 1993; Radostits, 2002). Segundo Ajayi *et al.* (1978), animais com boas condições nutricionais, como os deste trabalho, tendem a apresentar sinais clínicos mais evidentes e maiores reduções do hematócrito durante a fase de patência da doença, porém apresentam uma recuperação mais rápida, reduzindo o período convalescente. Por isso os prejuízos causados pela doença são enormes, mesmo nas áreas endêmicas, uma vez que os

animais acometidos são tratados tardiamente e demoram muito tempo até se recuperarem, ficando mais susceptíveis a ocorrência de doenças oportunistas, como a pneumonia, e apresentando grande atraso no seu desenvolvimento. Portanto a elaboração de estratégias para o diagnóstico precoce da doença e a elaboração de um protocolo de tratamento visando, não só o combate ao agente, mas principalmente a recuperação da anemia e dos distúrbios por ela provocados, pode minimizar os prejuízos causados pela anaplasnose, reduzindo o período convalescente e os índices de mortalidade.

Para a realização do diagnóstico e instituição do tratamento no momento correto da doença é necessário o acompanhamento freqüente dos animais e o monitoramento do hematócrito e da parasitemia. Porém, estes exames ainda não são acessíveis à maioria das propriedades brasileiras que não podem contar com mão de obra especializada tão freqüente e/ou adquirir os equipamentos necessários. Na impossibilidade da realização destes exames o melhor parâmetro a ser avaliado, que pode indicar o momento ideal para o tratamento com antibióticos antes do agravamento da anemia, é a temperatura retal, que deve ser aferida pelo menos três vezes por semana, no período da manhã, principalmente nas categorias mais acometidas pela doença, pois como foi verificado neste experimento ocorreu aumento no seu valor, durante apenas três ou quatro dias, concomitante ao aumento da parasitemia. Entretanto, devemos lembrar a febre na anaplasnose não é muito acentuada, além disso, é um sinal inespecífico e ocorre em várias situações diferentes. Deve-se, portanto, conhecer a epidemiologia da doença na propriedade e monitorar as categorias mais predispostas à doença.

No Experimento II, os animais apresentaram quedas de mais de 50% do hematócrito e sinais clínicos intensos da doença. A avaliação dos parâmetros bioquímicos revelou aumento nas concentrações séricas de uréia nitrogenada (BUN) e redução dos níveis de glicose e hemoglobina. As alterações nos parâmetros

hematológicos indicaram a ocorrência de uma anemia inicialmente normocítica e normocrômica evoluindo para macrocítica e normocrômica. Também foi observada uma leucocitose devida ao aumento nas contagens de linfócitos e neutrófilos. Os animais apresentaram redução nos níveis de Na^+ , Cl^- e HCO_3^- e aumento nas concentrações de K^+ . Os exames de gasometria revelaram a ocorrência de uma forte acidose metabólica com aumento da diferença aniônica e do déficit de bases, redução da pCO_2 e da tCO_2 . Foi observada a existência de uma forte correlação positiva entre os valores do hematócrito com as concentrações de Na^+ , Cl^- e HCO_3^- permitindo a realização de um cálculo para estipular o déficit destes íons a partir do valor do hematócrito. Com base nestes cálculos pode-se formular uma solução isotônica de fornecimento oral para reposição destes íons, principalmente o HCO_3^- essencial para a correção da acidose metabólica e de glicose, para disponibilizar energia para os tecidos, inclusive o sistema nervoso central, uma vez que, normalmente, os animais não se alimentam durante a fase aguda da doença.

Os aumentos significativos nas freqüências cardíaca e respiratória, observados durante praticamente todo o período patente, no Experimento II, são uma resposta fisiológica às alterações causadas pela hipóxia tecidual e acidose metabólica, provocadas pela anemia. O aumento na freqüência cardíaca só ocorre quando as concentrações de hemoglobina estão muito baixas para garantir uma melhor distribuição do oxigênio nos tecidos. O aumento da freqüência respiratória ocorre secundariamente à anemia e à acidose metabólica sendo responsável pela oxigenação do sangue e pela eliminação do CO_2 principal componente respiratório da acidose (Williams *et al*, 1972). Notamos claramente a ativação dos mecanismos fisiológicos de compensação da acidose metabólica provocada pela anemia aguda na fase de patência na anaplasnose. Inicialmente, verificou-se um aumento significativo da freqüência respiratória permitindo maior excreção de CO_2 confirmada pela redução da pCO_2 . Juntamente com o aumento da freqüência

respiratória foi observada uma drástica redução dos níveis de HCO_3^- , principal tampão do LEC e maior responsável pela manutenção do pH sanguíneo (Cunningham, 1993). Estes são os dois mecanismos de compensação rápida da acidose metabólica. O terceiro mecanismo de ação lenta e prolongada responsável pela compensação a longo prazo da acidose é a excreção renal dos íons H^+ , confirmada pela acidificação do pH da urina após o pico de anemia (Tietz *et al*, 1994). Quando estes mecanismos não são capazes de compensar a acidose o prognóstico do animal é desfavorável. A manipulação do bezerro que morreu para coleta de material talvez tenha sido o fator desencadeante de um aumento da demanda de oxigenação tecidual além da capacidade compensatória, uma vez que o hematócrito, o pH sanguíneo, as concentrações de hemoglobina e de HCO_3^- , estavam muito baixas. Nos animais a campo, as chances de sobrevivência diminuem ainda mais, pois nos sistemas de criação utilizados são submetidos a exercícios físicos constantes e os doentes permanecem no mesmo manejo dos demais.

Foi observada uma alta incidência de diarreia e pneumonia, principalmente durante o Experimento I. A ocorrência das diarreias se concentrou no período de adaptação, nas primeiras duas semanas do experimento, e foi atribuída à mudança do ambiente e da dieta dos bezerros, recém chegados da fazenda. Foi observada a ocorrência de pneumonia em cinco dos seis animais experimentais entre as duas semanas seguintes ao dia 0, entre o 4º e 15º dia após o pico de anemia. Os bezerros foram tratados com penicilina procaína na dosagem de 30000 UI/Kg, durante cinco dias consecutivos. A ocorrência da anaplasmosse e pneumonia é comumente relatada por veterinários e produtores apontando a existência de uma possível ligação entre as duas doenças, como também foi observado durante o experimento.

O aumento na frequência respiratória causado pela anemia pode ser o fator chave de ligação entre a anaplasmosse e às pneumonias. O aumento da ventilação

pulmonar expõe os pulmões a uma maior carga de partículas e microorganismos do ambiente que, associado à desidratação, levando a menor produção e ao espessamento do muco secretado pela mucosa do sistema respiratório, dificultando os batimentos ciliares e conseqüentemente o “*clearance*” dos pulmões. Além disso todas as alterações provocadas pela anaplasmosse contribuem para o estabelecimento de um quadro de imunossupressão favorecendo a ocorrência de pneumonia.

Outro fator a ser considerado, que pode ter influenciado a ocorrência de pneumonias durante o experimento foi a alta amplitude térmica observada na cidade de Belo Horizonte no início do Experimento I.

É importante ressaltar que a ocorrência de pneumonia durante os períodos de incubação, patência e até o final do período convalescente da anaplasmosse, piora o prognóstico uma vez que a correção das alterações provocadas pela anemia, principalmente a acidose metabólica, depende em grande parte de da saúde pulmonar.

Uma vez que a intensidade da doença é influenciada pela idade dos animais, pelo grau de imunidade e pela capacidade do sistema imune em produzir uma resposta humoral e celular eficiente (Wandrugala e Ristic, 1993), não foi possível realizar comparações entre o comportamento clínico dos animais inoculados com as cepas com e sem apêndice. Porém o maior período de incubação da doença observado nos animais do Experimento I, e a manifestação de sinais clínicos discretos, permite a caracterização da amostra com apêndice, como sendo de menor patogenicidade do que a amostra sem apêndice.

6. Conclusões

A análise das alterações clínicas e do equilíbrio eletrolítico e ácido básico dos quadros de anaplasmosse experimental obtidos no presente trabalho permitiu as seguintes conclusões:

A anaplasmosose em bezerros apresenta período de patência e convalescência longos e é responsável por causar anemia intensa;

As alterações clínicas são pouco intensas no início da doença e só se intensificam quando a anemia é grave;

Os animais enfermos apresentam acidose metabólica proporcional ao grau de anemia e conseguem sobreviver quando os mecanismos de compensação são eficientes;

Existe uma correlação entre o hematócrito e as concentrações sanguíneas de Na^+ , Cl^- e HCO_3^- , permitindo calcular seus valores a partir do hematócrito;

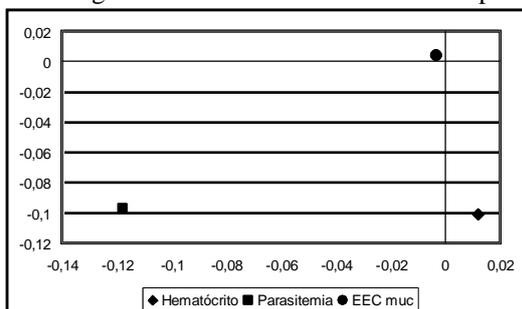
7. Referências Bibliográficas

- AJAYI, S.A.; WILSON, A.J.; CAMPBELL, R.S.F. Experimental bovine anaplasmosis: clinico-pathological and nutritional studies. *Res. Vet. Sci.*, n.25, p.76-81, 1978.
- ALLEN, P.C.; KUTLER, K.L. Effect of *Anaplasma marginale* infection upon blood gases and electrolytes in splenectomized calves. *J. Parasitol.*, v.67, n.6, p.954-956, 1981.
- ALLEN, P.C.; KUTLER, K.L. AMERAULT, T.E. Clinical chemistry of anaplasmosis: blood chemical changes in infected mature cows. *Am. J. Vet. Res.*, v.42, n.2, p.322-328, 1981.
- ALLBITRON, A.R.; SEGER, C.L. The transport of bile pigments in anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.*, n.23, p.1011-1018, 1962.
- AMERAULT, T.E.; ROBY, T.O. A rapid agglutination test for bovine anaplasmosis. *J.A.V.M.A.*, v.153, n.12, p.1828-1831, 1968.
- ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C. R.; LEAL, C. R. B. *et al.* Frequência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 50, n.3, p.243-246, 1998.
- ARTECHE, C. C. P. Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil. Uso de cepas atenuadas de *Babesia spp* e de cepa heteróloga de *Anaplasma*. *A Hora Vet.*, v. 11, n. 66, p. 39-42, 1992.
- BAKER, N.F.; OSEBOLD, J.W.; CHRISTENSEN, J.F. Erythrocyte survival in experimental anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* p.590-596, 1961.
- BENESI, F.J.; HOWARD, D.L.; SÁ, C.S.C. *et al.* Relato de um caso de transmissão transplacentária de anaplasmosose bovina. Observações clínico-laboratoriais. *R. Bars. Ci. Vet.*, v.6, n.3, p.175-176, 1999.
- BRAZ, C.J.; RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D. *et al.* Development of an ELISA system for detection of anti- *Anaplasma marginale* antibodies in cattle in Brazil. *J. vet. Med.* n.47, p.241-248, 2000.
- BUENING, G.M. Cell-mediated immune responses in calves with anaplasmosis. *Am. J. Vet. Res.* v.34, n.6, p.757-763, 1973
- COLES, E.H. *Veterinary clinical pathology*. 4thed. WB Saunders Company: Philadelphia, 1986. 486p.
- CONNEL, M. Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. *Queensland J. Agr. An. Sci.* v.31, n.3, p.185-195, 1974.
- CUNNINGHAM, J.G. *Tratado de fisiologia veterinária*. 2^aed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1993, 454p.
- Di BARTOLA, S.P. *Fluid therapy in small animal practice* 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000, 611p.
- DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M.. *Rosenberger: Exame Clínico dos Bovinos*. 3^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1993, 419p.
- FEITOSA, F. L. F. *Semiologia Veterinária: A arte do diagnóstico*. 1^a Edição. São Paulo: Editora Roca, 2004, 807p.

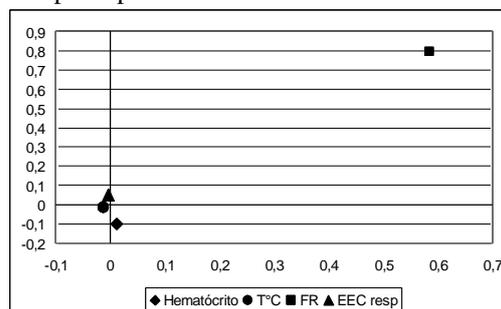
- FERREIRA, F. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos submetidos ao estresse calórico. Universidade Federal de Minas Gerais. 2005 132p.
- FETTMAN, M.J.; REBAR, A. Laboratory Evaluation of Renal Function. In: *Veterinary Hematology and Chemical Chemistry* 1st Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004, 518p., p.301-328.
- FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Characterization of functional domain of major surface proteins 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells *Vet. Microbiol.*, n.91, p.265-283, 2003.
- 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.
- GRAFIAS, C.R.B; ALVA, G.P.; AZOULAY, Y.R. *et al.* Estudio de la respuesta inmune humoral y celular en la infección y reinfección experimental de bovinos con *anaplasma marginale*. *Vet. Méx.*, v.34, n.3, p.247-259, 2003.
- JAIN, N.C. *Schalm's - Veterinary Hematology*. 4^a Ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1986, 1221p. p. 589-626.
- KESSLER, R.H.; SACCO, A.M.S.; MADRUGA, C.R. *et al.* Teste crítico de vacinas atenuadas de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* em novilhas da raça holandesa. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.7, n.1, p.1-5, 1998
- KIESER, S.T.; ERIKS, I.S.; PALMER, G.H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect. Immun.* v.58, n.4, p.1117-1119, 1990.
- KOCAN, K.M.; YELLIN, T.N.; EWING, S.A. *et al.* Morphologic of *Anaplasma marginale*, in nymphal *Demarcentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.* v.45, p.1434-1440, 1984.
- KOCAN, K.M.; FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A.A. *et al.* Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microb. Rev.* v.16, p. 698-712, 2003.
- LEW, A.E.; BOCK, R.E.; MINCHIN, C.M. *et al.* A msp1₄ polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Vet. Microbiol.*, n.86, p.325-335, 2002.
- LOSOS, G.J. Rickettsial Diseases – Anaplasmosis. In: *Infectious tropical diseases of domestic animals*. 1^a Ed., New York: Churchill Livingstone Inc., 1986, 938p., p. 742-795.
- MELÉNDEZ, R.D. Phagocytosis of *Anaplasma marginale* infected and uninfected erythrocytes by bovine peripheral blood leucocytes. *Rev. Cient. FCV-LUZ*. v.XV, n.4, p.305-309, 2005.
- MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. *Medicina de laboratório veterinária – Interpretação e diagnóstico*. 1^a Ed. São Paulo: Roca LTDA, 1995, 308p.
- MONKE, D.R.; KOCIBA, G.J.; DEJARNETE, M. *et al.* Reference values for selected hematologic and biochemical variables in Holstein bulls of various ages. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, n.11, p.1386-1391, 1998.
- NASCIMENTO, G.A.J; DANTAS, M.O.; LIMA, S.M. *et al.* Ocorrências de babesiose e anaplasiose no brejo paraibano. SI. Disponível em: http://www.agronline.com.br/agrociencia/pdf/public_48.pdf, acesso em 02 de outubro de 2006.
- OLIVEIRA, A. A.; PEDREIRA, P. A. S.; ALMEIDA, M. F. R. S. Doenças dos bezerros II. Epidemiologia da anaplasiose no Estado de Sergipe. *Arq. Méd. Vet. Zoot.* v. 44, n.5, p. 377-386, 1992.
- RADOSTITTS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. *et al.* *Medicina*

- Veterinária: Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos. 9ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2002, 1737p. p. 1132-1136.
- RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D.; GUIMARÃES, A.M. *et al.* Transmissão congênita da anaplasmosse bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* v.47, n.3, p.297-304, 1995.
- RIBEIRO, M.F.B.; REIS, R. Prevalência de anaplasmosse em quatro regiões do estado de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UFMG.* v.33, n.1, p.57-62, 1981a.
- RIBEIRO, M.F.B., REIS, R. Exposição natural de bezerros, em área endêmica de *Anaplasma marginale*, de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UFMG.* v. 33, p.63-6, 1981b.
- 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.; SALCEDO, J.H.P.; SANTOS, J.L. *et al.* Epidemiologia da Anaplasmosse bovina no estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 36, n.4, p. 425-432, 1984.
- RICHEY, E.J. Bovine Anaplasmosis In: Howard - Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice. 3rd Ed. Philadelphia:W.B. Saunders Company 1993, 1233p., p. 767-772.
- 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, n.5, p.849-855, 2001
- SAMPAIO, I.B.M. Análise de dados multidimensionais (Relatório de Pós-Doutorado). Madrid: Universidad Politécnica de Madrid, 123p., 1993.
- SOUZA, J.P.C.; SOARES C.O.; MASSARD C.L. *et al.* Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense *Pesq. Vet. Bras.* v.20, n.3, p.97-101, 2000.
- TASKER, J.B. Fluids, electrolytes and acid-base balance. In: KANEKO, J.J.; CORNELIUS, C.E. *Clinical Biochemistry of domestic animals* 2nd ed. New York: Academic Press, 1971, p.61-107.
- TIETZ, N.W.; PRUDEN, E.L.; ANDERSEN, O.S. Blood Gases and pH. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996, 836p., p.506-522.
- THRALL, A.M. *Veterinary Hematology and Chemical Chemistry* 1st Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004, 518p., p.301- 328.
- VIEIRA, M.I.B.; LEITE R.C.; MARTINS J.R. *et al.* Resposta imune humoral contra *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910) em bovinos submetidos a distintas estratégias de controle do carrapato vetor *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.11, n.2, p.71-76, 2002.
- WANDURAGALA, Z.; RISTIC, M. Anaplasmosis. In: *Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals.* 1^a Ed., New York: Pergamon Press Inc., 1993, 427p., p. 65-87.
- WAGHELA, S.D.; MELENDY, D.; CRUZ, D; WAGNER, G.G. Antigenic analysis of *Anaplasma marginale* grown in bovine erythrocytes co-cultured with bovine endothelial cells. *Vet. Parasitol.* n.94, p. 133-139, 2000.
- WICKWIRE, K.B.; KOCAN, K.M.; BARRON, S.T. *et al.* Infectivity of three *Anaplasma marginale* isolates for *Demarcentor andersoni*. *Am. J. Vet. Res.* v.48, p.96-99, 1987.
- WILLIAMS, W.J; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J. *et al.* *Hematology* 1st Ed. McGraw-Hill Book Company, 1972, 1479p.

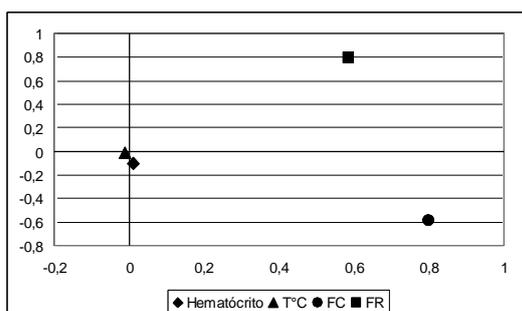
Análise gráfica de dados multidimensionais por componentes principais:



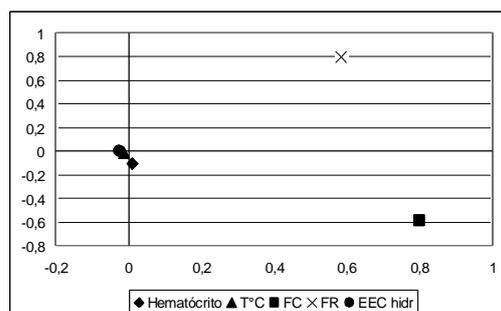
Anexo 1 – Análise de correlação entre hematócrito, parasitemia e escore de coloração mucosas na anaplasiose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros da raça holandesa preta e branca (HPB) (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



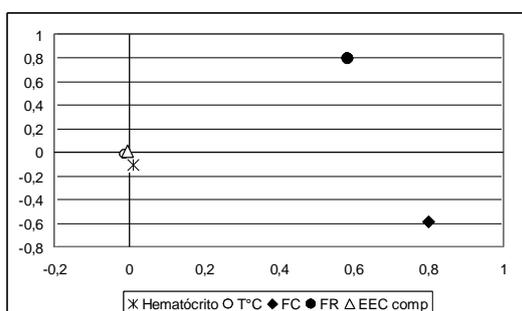
Anexo 2 – Análise de correlação entre hematócrito, temperatura, frequência respiratória e pontuação de exame do sistema respiratório na anaplasiose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros da raça holandesa preta e branca (HPB) (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



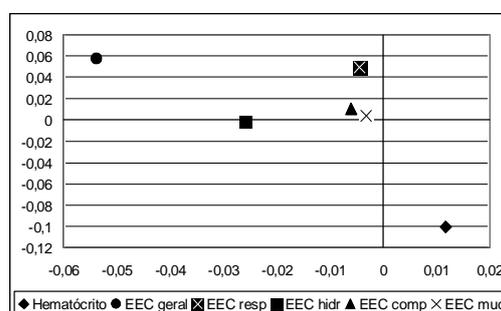
Anexo 3 – Análise de correlação entre hematócrito e os parâmetros fisiológicos na anaplasiose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros da raça holandesa preta e branca (HPB) (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



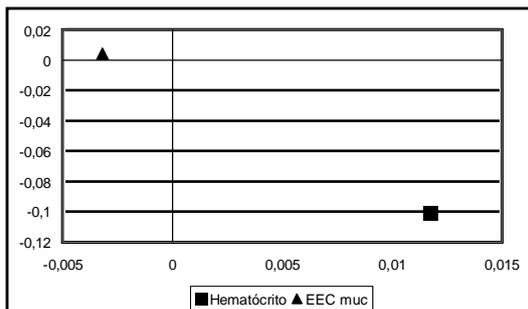
Anexo 4 – Análise de correlação entre hematócrito, parâmetros fisiológicos e escore de hidratação na anaplasiose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros da raça holandesa preta e branca (HPB) (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



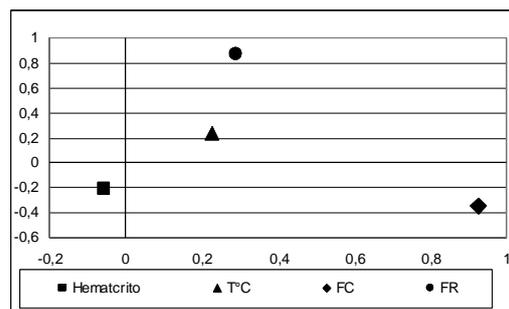
Anexo 5 – Análise de correlação entre hematócrito, parâmetros fisiológicos e escore de comportamento na anaplasiose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros da raça holandesa preta e branca (HPB) (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



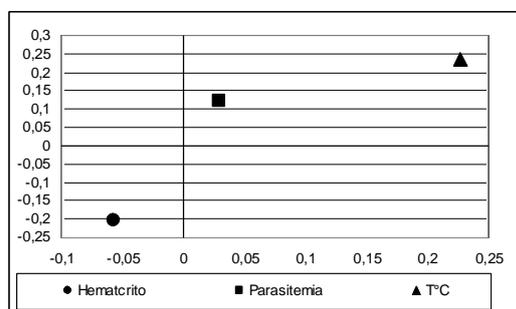
Anexo 6 – Análise de correlação entre hematócrito, parâmetros fisiológicos e escores de exames clínicos na anaplasiose, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* com apêndice, em bezerros da raça holandesa preta e branca (HPB) (n=6), com 30 a 40 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



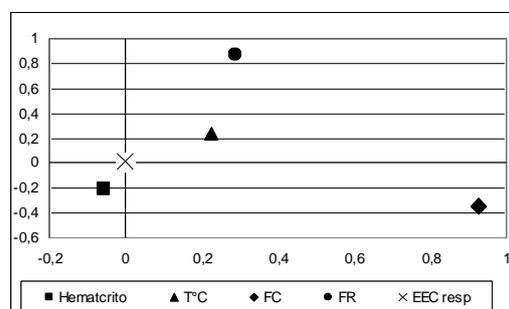
Anexo 7 – Análise de correlação entre hematócrito, parasitemia e escore de coloração de mucosas na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerras HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



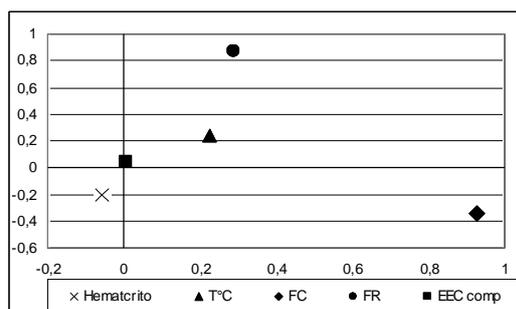
Anexo 9 – Análise de correlação entre hematócrito, parasitemia e parâmetros fisiológicos na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerras HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



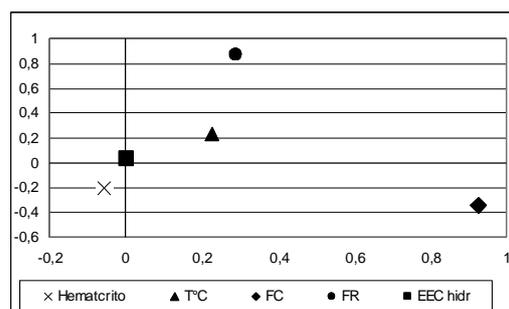
Anexo 8 – Análise de correlação entre hematócrito, parasitemia e temperatura retal na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerras HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



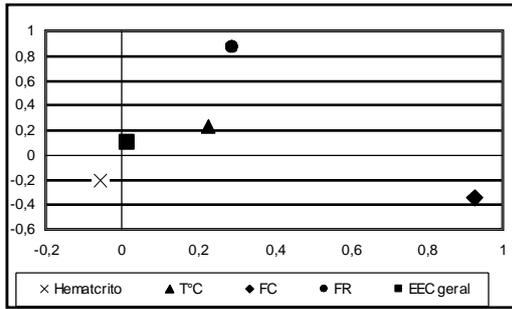
Anexo 10 – Análise de correlação entre hematócrito, parâmetros fisiológicos e escore de exame clínico do sistema respiratório na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerras HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



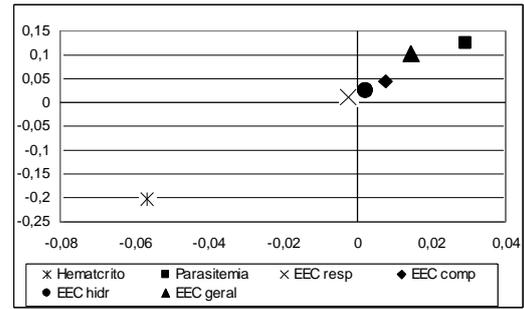
Anexo 11 – Análise de correlação entre hematócrito, parâmetros fisiológicos e escore de exame clínico de comportamento na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerras HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



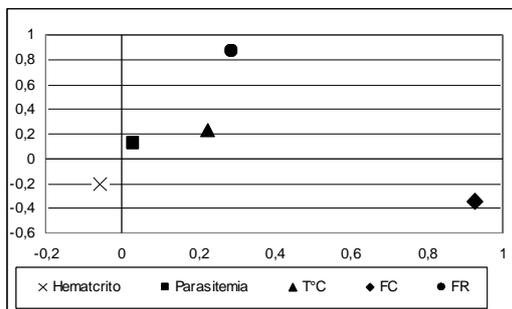
Anexo 12 – Análise de correlação entre hematócrito, parâmetros fisiológicos e escore de hidratação na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerras HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



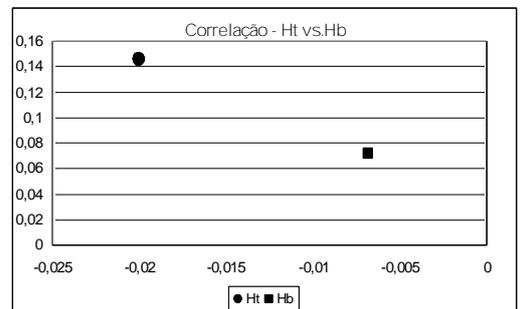
Anexo 13 – Análise de correlação entre hematócrito, parâmetros fisiológicos e escore de exame clínico geral na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



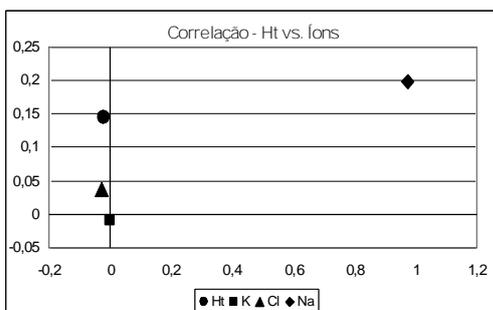
Anexo 14 – Análise de correlação entre hematócrito, parasitemia e escores de exame clínico na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



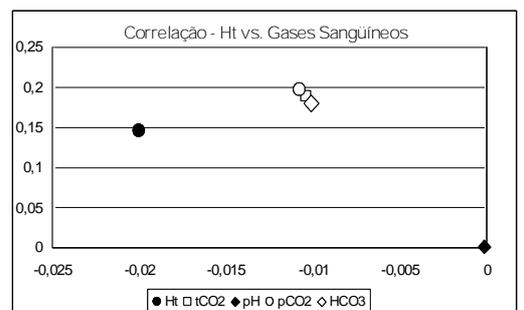
Anexo 15 – Análise de correlação entre hematócrito, parasitemia, T°C, FC e FR na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



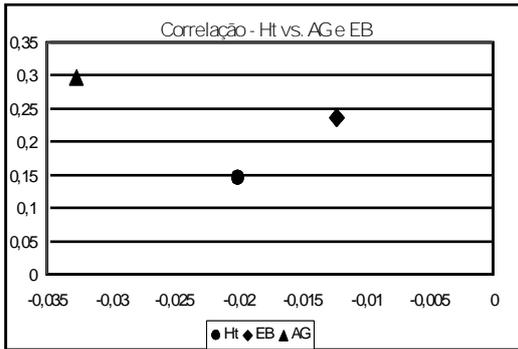
Anexo 16 – Análise de correlação entre hematócrito e a concentração sérica de hemoglobina na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



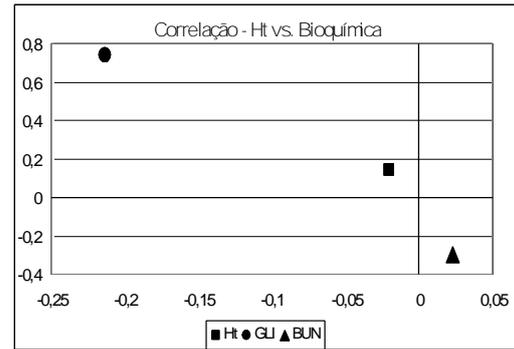
Anexo 17 – Análise de correlação entre o hematócrito, e as concentrações séricas de Na, Cl e K na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



Anexo 18 – Análise de correlação entre o hematócrito, a pCO₂, o pH e as concentrações séricas de HCO₃⁻ na anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



Anexo 19 – Análise de correlação entre o hematócrito, excesso de bases e ânion gap na anaplasmosse, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.



Anexo 20 – Análise de correlação entre o hematócrito, e as concentrações séricas de glicose e uréia na anaplasmosse, induzida pela inoculação de uma cepa de *A. marginale* sem apêndice, em bezerros HPB (n=5), com 90 a 110 dias de idade. Belo Horizonte, 2006.

Tabelas

Tabela 5 – Valores médios e desvios padrão das concentrações de Na⁺, Cl⁻, K⁺, HCO₃⁻ e do pH, pCO₂ e tCO₂ na fase de patência da anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de A. marginale sem apêndice, em bezerros HPB, com 90 a 110 dias de idade.

Data	Na ⁺ mmol/L	Cl ⁻ mmol/L	K ⁺ mmol/L	pH	pCO ₂ mmHg	HCO ₃ ⁻ mmol/L	tCO ₂ mmHg
-2	138±2,75	103±0,96	4,08±0,32	7,45±0,03	41±3,31	29±1,08	30±1,26
-1	136±2,61	100±1,41	4,26±0	7,46±0,02	39±3,61	28±2,45	29±2,49
0	134±2,23	99±2,56	4,18±0,21	7,41±0,08	34±5,32	22±5,33	23±5,64
1	136±4,08	100±4,36	4,20±1	7,39±0,11	36±6,73	23±6,98	24±7,31
2	136±3,83	100±4,51	3,60±0,39	7,42±0,02	37±1,79	24±2,24	25±2,50
3	137±4,34	102±3,21	4,24±0	7,39±0,05	42±3,86	25±1,72	27±2,17
4	138±4,55	100±3,58	3,70±0,22	7,42±0,04	43±3,21	28±1,73	29±1,73
5	140±1,29	101±0,96	3,60±0,27	7,42±0,04	45±2,93	29±1,34	31±1,50
6	140±1,83	101±2,75	3,63±0,46	7,41±0,04	46±2,38	29±1,94	30±2,06
7	140±1,73	102±0	3,63±0	7,40±0,01	44±2,71	27±2,32	29±2,31
8	141±0,71	104±2,12	4,15±0,21	7,42±0,01	46±1,63	30±0,07	31±0

Tabela 6 – Valores médios e desvios padrão das concentrações de BUN, hemoglobina e glicose e dos valores do hematócrito, BE e AG na fase de patência da anaplasmoze, induzida pela inoculação de uma cepa de A. marginale sem apêndice, em bezerros HPB, com 90 a 110 dias de idade.

Data	Ht%	Hb g/dL	BE	AG	BUN mg/mL	Glic. mg/mL
-2	24±7,68	5±2,71	5±0,96	11±0,82	10±6,03	89±16,11
-1	17±4,76	4±1,49	4±2,55	13±1,14	17±4,93	78±9,20
0	11±3,78	2±1,24	-3±6,62	18±6,05	23±7,97	55±20,00
1	14±3,39	3±1,51	-2±8,73	18±6,28	21±9,83	60±22,21
2	16±1,63	4±0,29	-1±2,65	16±3,06	12±1,00	81±23,39
3	17±4,69	5±0,54	1±2,61	14±1,67	13±1,92	68±8,58
4	19±2,97	6±1,10	3±2,30	13±1,30	10±2,77	69±12,98
5	24±2,65	7±0,50	5±2,22	13±1,41	7±2,22	70±4,90
6	26±3,27	7±1,18	5±2,52	14±1,29	8±2,63	72±7,42
7	27±5,29	7±1,21	2±2,65	14±1,73	11±2,08	78±4,73
8	29±0,71	8±0,28	6±0,71	12±0,71	9±0,00	80±12,02