

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

TESE

**Detecção de *Anaplasma marginale* por pesquisa de IgG e PCR em um
rebanho bovino da Baixada Fluminense**

Fábio Jorge Moreira da Silva

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO DE *Anaplasma marginale* POR PESQUISA DE IGG E PCR
EM UM REBANHO BOVINO DA BAIXADA FLUMINENSE**

FÁBIO JORGE MOREIRA DA SILVA

Sob a Orientação do Professor

João Luiz Horácio Faccini

e Co-orientação do Professor

Adivaldo Henrique da Fonseca

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ
Junho de 2012

636.208969
6
S586d
T

Silva, Fábio Jorge Moreira da, 1980-
Detecção de *Anaplasma marginale*
por pesquisa de IgG e PCR em um
rebanho bovino da Baixada Fluminense
/ Fábio Jorge Moreira da Silva. -
2012.

71 f.: il.

Orientador: João Luiz Horácio
Faccini.

Tese (Doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.

Bibliografia: f. 28-39.

1. Anaplasrose - Teses. 2.
Anaplasrose - Diagnóstico - Teses.
3. Bovino - Doenças - Baixada
Fluminense (RJ) - Teses. 4. Teste
imunoenzimático - Teses. I. Faccini,
João Luiz Horácio, 1947-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

Bibliotecário: _____

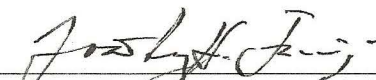
Data: ___/___/_____

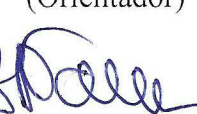
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

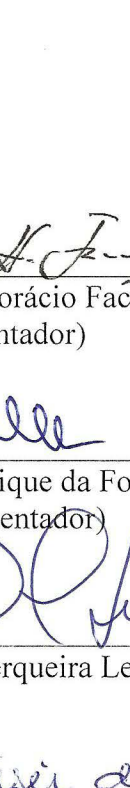
FÁBIO JORGE MOREIRA DA SILVA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM, 06 / 06 / 2012.


Prof. Dr. João Luiz Horácio Faccini - UFRRJ
(Orientador)



Prof. Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca - UFRRJ
(Co-orientador)


Prof. Dr. Romário Cerqueira Leite - UFMG


Profª Drª Carina Elisei de Oliveira - UCDB


Drª Luciana Gatto Brito - Embrapa Rondônia


Profª Drª Débora Decote Ricardo de Lima - UFRRJ


Prof. Dr. Douglas McIntosh - UFRRJ


Dr. Daniel da Silva Guedes Junior - Fiocruz-RJ

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha amada esposa Rubiana,
meus filhotes Davi e Maria Eduarda,
meus pais Jorge e Josefa,
meus sogros Roberto e Ana
e a toda minha família...*

Muito obrigado por fazerem parte da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e sempre a Deus, pois somente Ele sabe o quão foi difícil chegar até aqui...

Ao professor João Luiz Horácio Faccini pelo apoio incondicional durante a orientação deste trabalho.

Ao professor Adivaldo Henrique da Fonseca pela orientação, pelos anos de convívio e ensinamento profissional e pessoal, além do suporte integral para realização deste trabalho.

Aos grandes AMIGOS, parceiros e companheiros de longas e incansáveis jornadas, Daniel da Silva Guedes Júnior e Charles Passos Rangel, pois foi com a amizade e dedicação de vocês que chegamos ao final de mais este projeto.

Aos amigos Jenevaldo Barbosa da Silva e Antônio Amélia dos Santos Mucalane Tembue pelo imprescindível e divertido auxílio durante as coletas e processamento das amostras. Valeu mesmo!

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias, Rafaella Câmara Teixeira, Bruna de Azevedo Baêta, Fabíola do Nascimento Corrêa, Jania de Rezende, Matheus Dias Cordeiro, Jaqueline Rodrigues de Almeida Valim, Vanessa da Almeida Raia, Carla Carolina Dias Uzedo e seus colaboradores, pelo convívio e companheirismo profissional ao longo desses anos.

A pesquisadora responsável pelo Setor de Bovinocultura de Leite da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO) dr^a Rosane Scatamburlo Lizieire Fajardo pelo apoio incondicional durante o estudo, bem como a todos os funcionários da fazenda, pois, sem este apoio concreto nenhum trabalho teria sido realizado.

À professora Marília Massard da Fonseca, pelo convívio e amizade, sempre acolhedora e solícita.

Aos amigos do Laboratório de Morfogênese Celular e do Laboratório Nacional de Células-Tronco Embrionárias do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), representados pelos professores Vivaldo Moura Neto e Stevens Kastrup Rehen, respectivamente, pela cessão de equipamentos para processamento das amostras, além do acolhimento e convívio desde fevereiro de 2011.

Aos diversos amigos, colegas e professores que convivi durante os 11 anos de vida acadêmica na UFRRJ.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo precioso e fundamental apoio financeiro, além da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) que junto à comissão de orientação também concederam fomento e suporte ao estudo.

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização desta tese...

MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Fábio Jorge Moreira da Silva, filho de Jorge Paulo Moreira da Silva (*in memoriam*) e Josefa Ribeiro da Silva, nasceu em 31 de maio de 1980, na cidade do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro (RJ), Brasil. Concluiu em dezembro de 1998 o Ensino Médio no Colégio Pedro II e, em dezembro de 2000, o Curso Técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), ambos localizados no município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

No ano de 1999, prestou vestibular para o curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), iniciando sua graduação em março de 2001, colando grau e obtendo o título de Médico Veterinário em fevereiro de 2006.

Durante o período acadêmico realizou estágios em projetos de pesquisa do Instituto de Veterinária (IV) da UFRRJ, sendo bolsista de iniciação científica da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) de agosto de 2003 a julho de 2004 e bolsista de iniciação científica PIBIC/UFRRJ pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de agosto de 2004 a fevereiro de 2006, com estudos nas áreas de helmintologia, carrapatos e doenças transmitidas por carrapatos, no Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da UFRRJ, sob orientação do professor Aivaldo Henrique da Fonseca.

Pouco antes de concluir o curso de graduação, foi aprovado nos processos seletivos em níveis de Mestrado dos cursos de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (CPGCV) e em Medicina Veterinária, ambos da UFRRJ, optando por seguir no primeiro a partir de março de 2006.

Foi bolsista do CNPq e obteve grau de Mestre em Ciências, por concluiu sua dissertação no CPGCV/UFRRJ, na área de concentração Sanidade Animal em fevereiro de 2008, com o seguinte estudo: Relação entre infestação natural por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) e níveis de anticorpos da classe IgG para os agentes da Tristeza Parasitária Bovina e *Borrelia* sp. em bezerros.

Em março de 2008 ingressou no curso de Doutorado do CPGCV da UFRRJ, área de concentração Sanidade Animal, onde foi bolsista do CNPq até fevereiro de 2011. E, nesta data, apresenta e defende sua tese como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Durante sua jornada de formação participou de diversos congressos científicos, publicou oito artigos em periódicos indexados, mais de 30 em congressos e eventos científicos e participou da organização de duas Semanas Acadêmicas em Medicina Veterinária (SEMEV) da UFRRJ (2004 e 2005).

Foi premiado com o 1º lugar no VI Prêmio de Pesquisa Carlos Maria Antônio Hubinger Tokarnia (PRÊMIO TOKARNIA) da XX SEMEV – IV/UFRRJ e com o 3º lugar no VIII PRÊMIO TOKARNIA da XXII SEMEV – IV/UFRRJ, além de menção honrosa no mesmo evento.

Em fevereiro de 2011 tomou posse, após aprovação em concurso público, para o cargo de Técnico em Pesquisa da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), aonde vem desenvolvendo atividade nas áreas de ciências morfológicas e biologia celular e do desenvolvimento.

RESUMO

SILVA, Fábio Jorge Moreira da. **Detecção de *Anaplasma marginale* por pesquisa de IgG e PCR em um rebanho bovino da Baixada Fluminense**. 2012. 57p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

As atividades relacionadas a bovinocultura leiteira em sistemas de alta produtividade contribuem cada dia mais com o desequilíbrio saúde-doença, e aumentam a probabilidade de enfermidades compatíveis com as ectoparasitoses e as infecções transmitidas por estes vetores. Os objetivos do trabalho foram detectar a infecção por *Anaplasma marginale* de forma precoce e avaliar o nível de anticorpos IgG anti-*A. marginale* em bezerros nativos e naturalmente parasitados por *Rhipicephalus microplus* na Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro. São escassos os relatos sobre técnicas de diagnóstico molecular para este agente. Um total de 41 bezerras foi acompanhado do nascimento aos 180 dias de idade. Os animais pertenciam ao Centro Estadual de Pesquisa em Agricultura Orgânica da Pesagro-RJ. O estudo foi conduzido nas estações chuvosa e seca, e foram coletados um total de 1607 amostras, com intervalo inicial de três dias e processados utilizando o teste ELISA indireto e a técnica PCR. Os valores percentuais de soroprevalência para *A. marginale* em função da idade foram submetidos ao teste χ^2 a 5% de significância. A prevalência de anticorpos anti-*A. marginale* nos bezerros, em função da idade, foi de 39,8% do soro de animais com idade inferior a 30 dias, 23,3% entre 30 e 60 dias, 27,3% entre 60 e 120 dias e 38,2% entre 120 e 180 dias, com um percentual de 31,4% para as amostras de todo o grupo etário (180 dias). Bezerros com idade 30 - 60, 60 - 120 e 120 - 180 dias apresentaram respectivamente 1,90, 1,75 e 1,55 mais risco de serem soronegativos para *A. marginale* do que os animais recém nascidos. Os bezerros foram diagnosticados positivos a PCR em no máximo 13 dias de idade. Os valores demonstram que os animais estudados apresentaram baixos títulos de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale*, sendo mais suscetíveis a desenvolverem anaplasmose clínica entre 30 a 60 dias de vida. Os resultados do método PCR comprovaram a circulação de *A. marginale* em todos os animais antes de completarem 15 dias de vida e sugerem a possibilidade de ocorrer transmissão transplacentária no rebanho estudado.

Palavras-chave: Anaplasmose, bezerros, imunodiagnóstico, prevalência

ABSTRACT

SILVA, Fábio Jorge Moreira da. **Detection of *Anaplasma marginale* by IgG and PCR research on cattle herd in Baixada Fluminense**. 2012. 57p. Thesis (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Activities in high productivity systems to dairy cattle contribute to imbalance health and disease, and increase the possibility of illness compatible with the infestation and infections transmitted by arthropods vectors. The objectives were to evaluate the prevalence and the seroepidemiological condition for *Anaplasma marginale* in 41 calves from birth to completed 180 days. The animals belonged to “Centro Estadual de Pesquisa em Agricultura Orgânica” – Pesagro-Rio, Seropédica-RJ. There are few reports of molecular diagnostic techniques for this agent. The study was conducted during the rainy and dry seasons and collected a total of 1607 blood samples, initially every three days and processed using indirect ELISA test and PCR. Percent values for *A. marginale* seroprevalence as function of age were tested using the χ^2 test at 5% significance level. The prevalence of anti-*A. marginale* antibodies were 39.8% in calves aged less than 30 days, 23.3% between 30 and 60 days, 27.3% between 60 and 120 days and 38.2% between 120 and 180 days, with 31.4% for samples of all age group (180 days). Calves aged between 30 and 60, 60 and 120 and 120 and 180 days were respectively 1.90, 1.75 and 1.55 more likely to be seronegative for *A. marginale* than newborn ones. All calves were positive to PCR until 13 days old. The values show that during the study calves had low levels of antibodies to *A. marginale*, a condition that predisposes them to the development of clinical anaplasmosis. In addition, the herd was considered unstable epidemiologically to *A. marginale* infection. The results show that animals had low antibody titers of IgG anti-*A. marginale*, being more susceptible to develop clinical anaplasmosis from 30 to 60 days. The results of the PCR method confirmed *A. marginale* in all animals before they are 15 days old and suggest the possibility of transplacental transmission occurs in the herd.

Key words: Anaplasmosis, calves, immunodiagnosis, prevalence

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-------------------|--|
| A | base purina Adenina |
| C | base pirimidina Citosina |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| dNTPs | trifosfatos desoxirribonucleotídeos |
| EDTA | ácido etilenodiaminotetracético |
| ELISA | ensaio de imunoadsorção enzimático |
| Fg | Fentograma |
| G | base purina Guanina |
| g | grama |
| L | Litro |
| M | Molar |
| MgCl ₂ | cloreto de magnésio |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| mM | milimolar |
| ng | nanograma |
| OR | razão de chance |
| pb | pares de base |
| PBST | tampão salino fosfato Tween |
| PCR | reação em cadeia da polimerase |
| pH | potencial Hidrogeniônico |
| pmol | Picomol |
| q.s.p. | quantidade suficiente para |
| rRNA | ácido ribonucleico ribossômico |
| rpm | rotações por minutos |
| T | base pirimidina Timina |
| TAE | tampão Tris-Acetato-EDTA |
| Taq | enzima DNA polimerase isolada de uma bactéria <i>Thermus aquaticus</i> |
| U | Unidade |
| V | Volts |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |
| µM | Micromolar |
| ® | marca registrada |
| °C | graus Celsius |
| ™ | trade Mark |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabela 1. Classificação estimada dos soros testes de bezerros recém-nascidos na Baixada Fluminense-RJ, em NE (Níveis de iELISA) variando na faixa de 0-9 de acordo com a densidade óptica (DO) e número de soros por grupo de estudo, testados por iELISA anti- <i>Anaplasma marginale</i> , durante o período de 2009-2010..... | 19 |
| Tabela 2. Percentual de amostras de soro em cada grupo experimental de faixas etárias, testados por iELISA anti- <i>Anaplasma marginale</i> e classificadas em Níveis de ELISA (NE), durante o período de 2009-2010..... | 20 |
| Tabela 3. Frequência de anticorpos da classe IgG anti- <i>Anaplasma marginale</i> por faixa etária, em relação a quantidade de soro de bezerros até 180 dias em uma propriedade da Baixada Fluminense-RJ..... | 21 |
| Tabela 4. Avaliação da idade como fator de risco para a frequência de anticorpos da classe IgG anti- <i>Anaplasma marginale</i> pelo teste qui-quadrado em bezerros até 180 dias em uma propriedade da Baixada Fluminense-RJ..... | 22 |
| Tabela 5. Detecção da primo-infecção por <i>Anaplasma marginale</i> pela técnica da PCR em bezerros em relação ao dia após o nascimento, amostras coletadas em 2009 em uma propriedade da Baixada Fluminense-RJ..... | 24 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 1. Número de amostras de soro de bezerros até 180 dias em uma propriedade da Baixada Fluminense-RJ, testados por iELISA anti- <i>Anaplasma marginale</i> e classificadas em Níveis de ELISA (NE), durante o período de 2009-2010..... | 21 |
| Figura 2. Evolução do risco de infecção por <i>Anaplasma marginale</i> em bezerros recém-nascidos detectados positivos pela PCR, amostras coletadas em 2009 em uma propriedade da Baixada Fluminense-RJ..... | 24 |

SUMÁRIO

| CONTEÚDO | Páginas |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1 Aspectos gerais da Tristeza Parasitária Bovina (TPB)..... | 3 |
| 2.2 Aspectos gerais de <i>Anaplasma marginale</i> | 4 |
| 2.3 Transmissão de <i>A. marginale</i> | 6 |
| 2.4 Aspectos epidemiológicos de <i>A. marginale</i> | 7 |
| 2.5 Aspectos da imunidade contra <i>A. marginale</i> | 9 |
| 2.6 Diagnóstico de <i>A. marginale</i> | 10 |
| 2.6.1 Diagnóstico sorológico de <i>A. marginale</i> | 11 |
| 2.6.2 Diagnóstico molecular de <i>A. marginale</i> | 12 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 14 |
| 3.1 Local..... | 14 |
| 3.2 Animais..... | 14 |
| 3.3 Manejo nutricional..... | 14 |
| 3.4 Manejo sanitário..... | 15 |
| 3.5 Delineamento experimental..... | 15 |
| 3.6 Ensaio de imunoadsorção enzimática indireto (iELISA) para detecção de anticorpos da classe IgG para <i>Anaplasma marginale</i> | 16 |
| 3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação de <i>Anaplasma marginale</i> | 17 |
| 3.8. Análise estatística..... | 18 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 19 |
| 5 CONCLUSÕES | 27 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 28 |
| 7 APÊNDICES | 40 |

| | |
|---|-----------|
| I - Detecção da menor concentração de DNA amplificado por meio de diluições seriadas (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}) de DNA positivo em água ultrapura..... | 40 |
| II - Imagens do produto da amplificação do gene para MSP5 de <i>Anaplasma marginale</i> (458pb) pela técnica PCR de algumas amostras teste..... | 40 |
| III - Imagens de esfregaços sanguíneos de bezerros pertencentes a Pesagro-RJ, positivos para <i>Anaplasma marginale</i> (seta vermelha), corados por Giemsa. Aumento de 100x..... | 41 |
| IV - Artigo submetido à Revista Ciência Rural (ISSN: 0103-8478)..... | 42 |
| 8 ANEXOS..... | 54 |
| Anexo A - Protocolo de i-ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-<i>Anaplasma marginale</i> adaptado de Machado et al., 1997..... | 54 |
| Anexo B - Soluções utilizadas no i-ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-<i>Anaplasma marginale</i> adaptado de Machado et al., 1997..... | 55 |
| Anexo C - Protocolo para extração de DNA, adaptado de Sambrook et al., 1989..... | 56 |
| Anexo D - Protocolo da PCR para <i>Anaplasma marginale</i> (msp5), adaptado de Torioni de Echaide et al., 1998..... | 57 |

1 INTRODUÇÃO

A pecuária bovina no Brasil cresceu intensamente ao longo dos últimos anos, principalmente no que diz respeito às atividades relacionadas à bovinocultura leiteira. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2006) estimam que cerca de 20 milhões de cabeças estejam envolvidas na produção nacional de leite, e estudos da *Food and Agricultural Organization of the United Nations* (FAO, 2005) indicam o Brasil como o 7º principal produtor de leite no mundo.

A criação de animais em sistema de alta produtividade, visando maior lucratividade e rentabilidade, contribui cada vez mais com o aumento da probabilidade de ocorrência de endo e ectoparasitoses, fator este que, coloca em risco o equilíbrio saúde x doença, além de comprometer as principais iniciativas de melhoramento genético.

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é uma das mais importantes enfermidades que acometem rebanhos bovinos, tanto destinados à produção leiteira quanto os voltados a produtos cárneos, em diversas partes do mundo e é causada por um complexo de agentes etiológicos. Este nome é dado a associações causadas por protozoários do gênero *Babesia* e riquetsias do gênero *Anaplasma*. No Brasil os agentes são *Babesia bovis* (BABÉS, 1888), *B. bigemina* (SMITH; KIBORNE, 1893) e *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910).

Os hemoprotozoários do gênero *Babesia* são transmitidos pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887, MURRELL; BARKER, 2003), comum em muitas áreas de pastagens tropicais e subtropicais de todo Brasil.

A enfermidade causada pela riquetsia *A. marginale* é conhecida como anaplasmosse bovina, está amplamente distribuída nas áreas tropicais e subtropicais do mundo e é um dos principais problemas para a criação de bovinos em muitos países. Esta doença pode ser transmitida principalmente por carrapatos ixodídeos, que podem ser comuns na TPB, como os do gênero *Rhipicephalus*, e também o gênero *Dermacentor*. Causam importantes perdas econômicas, que são mensuradas por diversos parâmetros, tais como perda de peso, redução na produção de leite, abortos, custos com tratamentos e mortalidade (KOCAN et al., 2003, KOCAN et al., 2010).

O controle de *A. marginale* inclui ações contra os vetores, vacinação e quimioterapia nos animais (KOCAN et al., 2003, AUBRY; GEALE, 2011). A imunidade contra *A. marginale* é de duração variável, de origem humoral e celular. O diagnóstico na fase aguda pode ser realizado a partir de esfregaços sanguíneos (FARIAS, 1995) em associação com aspectos clínicos, e na fase crônica onde a riquetsemia geralmente é baixa, testes sorológicos (ELISA) e moleculares (PCR, nested PCR e PCR em tempo real), dentre outros, são os mais utilizados para detecção de *Anaplasma* spp. Estes últimos métodos apresentam grandes vantagens devido aos seus altos níveis de sensibilidade e especificidade (CORONA et al., 2000). A PCR convencional não permite uma detecção precisa da concentração inicial do DNA alvo, mas fornece relevantes resultados qualitativos.

Os testes sorológicos são considerados ferramentas importantes na avaliação de aspectos epidemiológicos, na prevalência de condições imunológicas e no controle das hemoparasitoses e seus transmissores (ARAÚJO et al., 1998). Além disto, auxiliam em decisões voltadas ao manejo, bem como a necessidade ou não de vacinações e outros fatores para manutenção da sanidade animal.

A dinâmica da infecção por hemoparasitos é dependente de fatores diversos, tais como a população de carrapatos infestantes, a capacidade de transmissão do carrapato, que pode estar correlacionada também à fase de desenvolvimento do artrópode; e a susceptibilidade dos bovinos, que pode variar com a raça, idade, escore nutricional e corpóreo, estado fisiológico e imunológico do indivíduo.

Com a justificativa de existirem ainda lacunas na literatura em relação ao agente *A. marginale*, considerado o mais patogênico para os bovinos, o presente estudo teve o intuito de diminuir estes espaços e possibilitar um melhor entendimento deste patógeno, pois são escassos os relatos de primo-infecção por esta riquetsia detectados principalmente por PCR.

Sendo assim, os objetivos foram detectar, pela primeira vez, a infecção por *A. marginale* de forma precoce, em uma propriedade dentro da zona endêmica da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro, além de avaliar o nível de anticorpos IgG anti-*A. marginale* em bezerros recém nascidos, nativos e naturalmente parasitados por carrapatos *Rhipicephalus microplus* nesta mesma região.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da Tristeza Parasitária Bovina (TPB)

Trata-se de uma síndrome produzida por hemoparasitos da família Babesidae, *Babesia bovis* e *B. bigemina* e da família Anaplasmataceae, *Anaplasma marginale*. Além destes, pode ocorrer o parasitismo associado a *A. bovis*, *Trypanosoma theileri* e *Borrelia theileri* (MASSARD et al., 1998).

Os hemoprotozoários do gênero *Babesia* são transmitidos pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*, comum em muitas áreas de pastagens tropicais e subtropicais do Brasil. Para riquetsia *A. marginale*, além da transmissão biológica pelo carrapato *R. microplus* (RIBEIRO, 1991), também é descrita a transmissão mecânica por picadas de dípteros hematófagos e a via iatrogênica (DIKMANS, 1950), além da transmissão transplacentária (SWIFT; PAUMER, 1976).

Rhipicephalus microplus é o carrapato mais importante para a indústria bovina mundial (PRUETT et al., 2008), pois além de seus efeitos diretos, é vetor de importantes patógenos (CONSTANTINOIU et al., 2010). No Brasil, o carrapato *R. microplus* é o único vetor biológico descrito para *A. marginale* (ALONSO et al., 1992; GUGLIELMONE, 1995). Embora os carrapatos sejam considerados os principais vetores do agente da anaplasmoze, o seu mecanismo de transmissão ainda não está bem definido (KESSLER; SCHENK, 1998). Esta enfermidade ocorre tanto em regiões tropicais e subtropicais como em zonas temperadas, pelo fato de existirem outras possíveis fontes de transmissão (RIET-CORREA et al., 2001).

Sinais e sintomas clínicos inespecíficos como febre, anemia, icterícia e depressão, podem ser sugestivos da TPB. Em alguns casos, distúrbios neurológicos podem exigir, diagnóstico diferencial com outras patologias, como a raiva, intoxicações por plantas tóxicas, neosporose e encefalomaláceas. No caso específico de *B. bigemina*, a anemia hemolítica com hemoglobinúria pode ser observada, como sintoma mais importante. Para *B. bovis*, a apresentação clínica pode ocorrer de forma aguda ou superaguda, onde o animal pode ir a óbito em poucas horas após manifestação dos primeiros sintomas de caráter neurológico. Este agente provoca alterações em eritrócitos, fazendo com que se acumulem em capilares de órgãos internos, dificultando a circulação e a oxigenação, levando a conseqüentes sintomatologias nervosas.

No caso de anaplasmoze, em geral, a manifestação predominante é crônica, em que, ao ser percebida, o animal apresenta uma anemia profunda (KESSLER; SCHENK, 1998). Para efeitos de tratamento, o diagnóstico clínico deve ser confirmado pelo exame laboratorial, a fim de facilitar o diagnóstico diferencial com outras doenças.

Quando bovinos não imunizados são introduzidos em pastagens infestadas por carrapatos *R. microplus* infectados por agentes da TPB, após aproximadamente 10 dias de fixação, tendem a surgir os primeiros sintomas. Primeiro por *B. bigemina*, e dias mais tarde surgem àqueles compatíveis com *B. bovis*, que podem coincidir com a sintomatologia para infecção por *A. marginale* (KESSLER; SCHENK, 1998).

O período de incubação da babesiose em bovinos é de 8 a 10 dias, sendo que *B. bovis* é transmitida por larvas de *R. microplus* a partir do primeiro dia de parasitismo, entretanto *B. bigemina*, que é transmitida pelo estágio de ninfa e adulto, só ocorrerá cerca de 8 dias após a fixação das larvas (MASSARD et al., 1998). *Anaplasma marginale* tem o período de incubação a partir de 7 dias e pode chegar a 60 (KOCAN et al., 2003).

Muitas circunstâncias levam à ocorrência de surtos de TPB, entre as mais importantes destaca-se a introdução de animais sensíveis e criados em áreas livres de carrapatos em áreas enzoóticas, a introdução de animais parasitados por carrapatos em áreas livres, a redução natural e temporária da população de carrapatos devido às condições climáticas desfavoráveis e a redução temporária por meios artificiais, tais como combate intensivo aos carrapatos através de

tratamentos carrapaticidas, descanso de pastagens, rotação de culturas, queimadas e criação de raças mais resistentes (SOARES et al., 2000; SOUZA, 2000). De acordo com Madruga et al. (2000) e Souza et al. (2000), o estudo epidemiológico das babesioses em bovinos numa determinada área, pode revelar a possibilidade ou não da ocorrência de surtos. E essa possibilidade é avaliada segundo a situação epidemiológica que pode ser de estabilidade enzoótica, instabilidade e situação de área marginal. Tais informações podem ser extrapoladas para os estudos epidemiológicos das anaplasmoses.

2.2 Aspectos gerais de *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale é uma bactéria intraeritrocítica obrigatória que causa anaplasmose em bovinos e outros ruminantes (PALMER; MCGUIRE, 1984, KOCAN et al., 2003). A espécie *A. marginale* foi primeiramente descrito por Theiler, 1910, na África do Sul, em eritrócitos de bovinos diagnosticados com anemia. Inclusões localizadas dentro das hemácias e dispostas na porção marginal destas células foram observadas. Após as publicações de Theiler, a anaplasmose foi amplamente reconhecida na região tropical, subtropical e em muitas zonas temperadas do continente Europeu (KOCAN et al., 2010).

O gênero *Anaplasma* está incluído no Super-reino Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae. As características descritivas do gênero *Anaplasma* foram alteradas para inclusão do gênero *Ehrlichia* (DUMLER et al., 2001). Dessa forma, são classificados como membros do gênero *Anaplasma*, bactérias gram-negativas, pequenas, muitas vezes pleomórficas, cocóides a elipsoidais, e podem ser encontrados individualmente ou em inclusões compactas formadas por várias unidades, denominadas mórulas. Geralmente, parasitam células hematopoiéticas, maduras ou imaturas, particularmente células mielóides e neutrofílicas, em sangue periférico ou tecido de órgãos ricos em fagócitos mononucleares como o baço, fígado e medula óssea de hospedeiros mamíferos (POPOV et al., 1998).

Atualmente o gênero *Anaplasma* é composto por seis espécies: *Anaplasma marginale* (espécie tipo), *A. centrale*, *A. ovis*, *A. bovis*, *A. platys* e *A. phagocytophilum*. Estes microrganismos são parasitas intracelulares obrigatórios, encontrados exclusivamente dentro de vacúolos ligados à membrana citoplasmática da célula do hospedeiro. Além disso, quase todos os organismos designados à família Anaplasmataceae multiplicam-se tanto em vertebrados quanto em invertebrados (DUMLER et al., 2001).

Anaplasma marginale é transmitido de forma biológica por carrapatos (PALMER et al., 2000; KOCAN et al., 2004), como exemplos temos os do gênero *Rhiphicephalus* (América, África e Austrália), espécies *R. microplus* e *R. simus* (África do Sul), espécie *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis* e *D. occidentalis* (América do Norte). Pode ocorrer mecanicamente por insetos hematófagos dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys*, possivelmente por *Haematobia*, *Psorophora* e outros (EWING, 1981), iatrogênica por fômites contaminados com sangue, principalmente agulhas (KOCAN et al., 2010) e, há também, relatos que envolvem a transmissão para a prole durante a gestação (SWIFT; PAUMER, 1976, CORREA et al., 1978, AUBRY; GEALE, 2011).

Pesquisas recentes têm demonstrado que a transmissão biológica por carrapatos é mais eficiente do que a transmissão mecânica por moscas (SCOLES et al., 2005). No entanto, algumas cepas de *A. marginale* não são infectantes para carrapatos, sendo a única forma de transmissão a mecânica (KOCAN et al., 2004).

O período de incubação da infecção em ruminantes é dependente do número de organismos por dose infectante, e pode variar de 07 a 60 dias, com média de 28 dias (GALE et al., 1996, KOCAN et al., 2003).

As riquetsias invadem o eritrócito, e dentro do sistema retículo-endotelial bovino, sofrem ciclos de replicação, remoção e podem inclusive infectar novos eritrócitos. Em

seguida, estas células infectadas são fagocitadas pelo sistema imune, o que resulta no desenvolvimento de anemia inicialmente branda podendo chegar a severa, e icterícia sem hemoglobinemia e hemoglobinúria (KOCAN et al., 2003). Os sinais clínicos podem incluir febre, perda de peso, aborto, letargia, diminuição na produção de leite e carne e, frequentemente, morte (PALMER et al., 1999).

O ciclo evolutivo de *A. marginale* é complexo e sincronizado com o ciclo de alimentação dos artrópodes vetores (KOCAN et al., 2010). Embora os carrapatos sejam considerados os principais vetores do agente da anaplasiose, o mecanismo de transmissão no interior do hospedeiro invertebrado não está bem caracterizado (KESSLER; SCHENK, 1998).

No carrapato vetor *A. marginale* invade células do intestino médio imediatamente após a ingestão de eritrócitos infectados. Os eritrócitos ingeridos contêm a forma infectante do organismo conhecida como corpúsculo denso. À microscopia eletrônica, estas formas são altamente densas, com estruturas pouco visíveis (RIBEIRO; LIMA, 1996; KOCAN et al., 2004).

Com base em estudos em uma linhagem de células de carrapato IDE8, a infecção de células ocorre aproximadamente 15 minutos após a ingestão por aderência da forma densa na membrana da célula hospedeira. Projeções das células do intestino médio dos carrapatos aderem à membrana externa de *A. marginale*, e invaginam em torno do organismo. Posteriormente, o microorganismo é totalmente encapsulado e internalizado dentro de um vacúolo fagocitário e permanece dentro do vacúolo durante todo o ciclo de vida (BLOUIN; KOCAN, 1998, KOCAN et al, 2004). Uma vez no vacúolo, o organismo muda para forma reprodutiva conhecida como vegetativa ou reticulada. Esta forma tem grandes e separados organismos com uma matriz que fica levemente reluzente a microscopia eletrônica (KOCAN et al, 1992; RIBEIRO; LIMA, 1996;. KOCAN et al, 2004). A replicação intracelular de *A. marginale* por fissão binária começa dentro das células epiteliais do intestino médio. Em torno de 2 dias de ingestão, células do intestino médio são infectadas por muitas colônias que contêm a forma reticulada de *A. marginale*. Três dias pós-infecção, existe uma combinação de pequenas formas densas e grandes formas reticuladas, com esta última se dividindo por fissão binária. No 4º dia, a maioria das colônias contém formas principalmente densas e observa-se um processo de exocitose dos patógenos. As membranas das colônias do organismo se fundem com membranas das células do intestino médio dos carrapato, com isto um canal de comunicação é aberto entre as membranas, que permite que formas densas saiam para o espaço extracelular, sem perda de citoplasma do hospedeiro (BLOUIN; KOCAN, 1998). Nesta fase, as formas densas podem invadir novas células do intestino médio dos carrapato ou penetrar através da parede intestinal e entrar na hemolinfa (KOCAN et al., 2004).

Ribeiro e Lima (1996) não observaram as primeiras colônias de *A. marginale* em carrapatos *R. microplus* naturalmente infectados antes de 19 dias após o desprendimento de fêmeas ingurgitadas de bezerros infectados experimentalmente. Na hemolinfa, as formas densas do organismo são transportadas para os ovários e células acinares das glândulas salivares (RIBEIRO, 1991; RIBEIRO; LIMA, 1996). Depois de invasão destas células, um segundo ciclo de replicação ocorre e os microorganismos podem aparecer em apenas 8 dias após a ingestão de eritrócitos infectados, com níveis de 10^4 a 10^5 organismos por glândula salivar para as alimentações subsequentes (KOCAN et al., 1992; KOCAN et al, 2002; LOHR et al., 2002; FUTSE et al, 2003).

Os resultados da replicação de *A. marginale* dentro dos carrapatos são similares nas células acinares, independentemente dos níveis iniciais de riquetsemia do hospedeiro no momento da alimentação (ERIKS et al., 1993). Quando um carrapato infectado se fixa em um hospedeiro vertebrado, a forma infectante de *A. marginale* é transportada a partir de células acinares positivas pela saliva do artrópode para o animal.

Células IDE8 são linhagens de células derivadas de embriões dos carrapatos *Ixodes scapularis* amplamente utilizado em muitos laboratórios para propagar *Anaplasma* spp. O ciclo

de desenvolvimento nestas células cultivadas em escala é semelhante ao carrapatos naturalmente infectados. *Anaplasma marginale* cultivados nesta linhagem mantêm a composição antigênica e infecciosidade para bovinos (BLOUIN; KOCAN, 1998; KOCAN et al., 2001).

Todas as proteínas principais de superfície (MSPs) foram detectadas e são conservadas em cultura de células deste organismos (BARBET, 1995). No entanto, *A. marginale* em desenvolvimento dentro de carrapatos *Ixodes* levanta a possibilidade de que a fase de infecção no interior da glândula salivar pode ser antigenicamente diferente em comparação com os organismos adquiridos a partir de rebanho infectado (PALMER et al., 1999).

Anaplasma marginale se desenvolve no hospedeiro vertebrado em vacúolos ligados à membrana ou em colônias (estado vegetativo), sendo a primeira forma a reticulada, que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que contém centenas de organismos. Esta forma muda para corpúsculos densos, que é o estágio infectante e pode sobreviver fora das células do hospedeiro. Os bovinos se tornam infectados quando as inclusões densas são transmitidas durante a alimentação dos carrapatos, via glândula salivar (KOCAN et al., 2003). Após a penetração nos eritrócitos, formando um vacúolo parasitóforo a partir da membrana da célula hospedeira, ocorre multiplicação de *A. marginale*, e cada inclusão (com até 1 µm de diâmetro) pode conter de quatro a 10 corpúsculos iniciais (RISTIC, 1960; KOCAN et al., 2010).

Os animais que sobrevivem à fase aguda da anaplasmoose tornam-se portadores crônicos da doença, caracterizados por ciclos de baixas riquetsemias e tornam-se reservatórios de *A. marginale*, e pode permanecer por toda a vida do animal (ERIKS et al., 1993). Nos casos de infecção aguda, a concentração de agentes circulantes pode atingir picos maiores que 10^8 eritrócitos infectados por mililitros de sangue. Há uma fase de crescimento exponencial que permite a multiplicação do número de agentes em menos de 24 horas pós infecção (EWING, 1981). Nos animais persistentemente infectados o valor pode variar de 10^3 a 10^6 eritrócitos infectados/mL de sangue (ERIKS et al., 1989), o que torna a detecção na circulação sanguínea mais difícil mesmo por PCR.

As estratégias de controle atualmente utilizadas, baseiam-se no uso de acaricidas, com a finalidade principal de controle do vetor, em conjunto com vacinas que protegem contra doença clínica, mas isto não previne a infecção persistente (POTGIETER; STOLTZ, 1994).

Aquelas focadas no controle da infecção aguda servem somente para diminuir a incidência de novas infecções, para isto, devem incluir a restrição da transmissão de *A. marginale* de indivíduos infectados cronicamente para os carrapatos. Este procedimento pode ser obtido através da associação de alguns métodos, principalmente as terapias por antibióticos a base de tetraciclínas que atuam sobre as formas infectantes de *A. marginale*.

O uso de quimioterapia/quimioesterilização ou vacinas não serve para diminuir o número de indivíduos cronicamente infectados. Atua apenas bloqueando, em parte, a transmissão à carrapatos, pela restrição da infecção ou replicação do patógeno dentro do carrapato (KOCAN et al., 2010).

Os acaricidas têm sido amplamente utilizados na tentativa de controlar a população de vetores, mas este processo é de certa forma muito oneroso e pode levar a resistência dos carrapatos aos produtos, além de ser altamente prejudicial ao ambiente (ERIKS et al., 1993).

2.3 Transmissão de *A. marginale*

A transmissão de *A. marginale* pode ser realizada de forma biológica, mecânica ou transplacentária. A transmissão biológica é realizada por carrapatos ixodídeos e aproximadamente 20 espécies foram citadas como vetores (DIKMANS et al., 1950). Carrapatos machos *Dermacentor andersoni* e *D. variabilis* têm sido apontados como os principais transmissores biológicos em áreas com temperaturas predominantemente temperadas (KOCAN

et al., 2004) e, nas demais áreas geográficas onde a anaplasmose está presente, vários outros gêneros de carrapatos são descritos como transmissores.

No Brasil e em parte da América do Sul, o vetor biológico é principalmente o carrapato *R. microplus* (AGUIRRE et al., 1994, KESSLER, 2001). Trata-se de um artrópode adaptado aos climas tropical e subtropical, onde a temperatura e a umidade propiciaram condições favoráveis à sobrevivência e manutenção da espécie (MADRUGA et al., 1987).

Outro mecanismo de transmissão biológica pode ocorrer dentro da população de carrapatos, e ocorre de duas formas, transtadial (a partir de um estágio para outro) e intra-estadial (dentro da mesma fase), este último realizado por carrapatos adultos machos quando se deslocam de um hospedeiro para outro (KOCAN et al., 1992). Estudos demonstraram que carrapatos machos podem desempenhar um papel importante na transmissão biológica de *A. marginale* porque são persistentemente infectados com o patógeno e podem transmitir a rickettsia repetidamente por se deslocarem de um animal a outro (KOCAN et al., 1992).

A transmissão mecânica ocorre via fômites contaminados com sangue, como agulhas, instrumentos de descorna e de tatuagem, aparatos para colocação de brincos e instrumentos de castração (KOCAN et al., 2003) ou por dípteros hematófagos, principalmente os dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys* (POTGIETER et al., 1981, FOIL, 1989), embora, ainda muito contestada e criticada por pesquisadores (KESSLER, 2001). Scoles et al. (2005) apresentaram resultados expressivos de que na Flórida a transmissão de *A. marginale* é mais eficientemente realizada por moscas, visto que a cepa não é infectiva para os carrapatos. A forma de transmissão mecânica é provavelmente a rota principal de transmissão para *A. marginale* em determinadas áreas dos Estados Unidos, América Central e do Sul e África, onde carrapatos vetores estão ausentes (EWING, 1981).

A transmissão transplacentária foi relatada por Zaugg e Kuttler (1984), Swift e Paumer (1976) e Norton et al. (1983). Episódios de aborto ou seqüelas reprodutivas em decorrência a infecção por *A. marginale* foram descritos por Fowler e Swift (1975), Correa et al. (1978) e Norton et al. (1983). Na maioria dos casos estudados, os fetos foram infectados quando a vaca havia sido infectada durante o período de gestação (KESSLER, 2001), embora outros autores indiquem que a transmissão intra uterina ou transplacentária possa ocorrer em vacas cronicamente infectadas (RIBEIRO et al., 1984).

A infecção dos carrapatos através do repasto/alimentação em animais persistentemente riquetsêmicos parece ser relativamente eficiente (ERIKS et al., 1993). Quando bovinos não imunizados são introduzidos em um pasto infestado por carrapatos infectados, após aproximadamente 10 dias de fixação, tendem a surgir os primeiros sintomas do complexo TPB (KESSLER; SCHENK, 1998).

2.4 Aspectos epidemiológicos de *A. marginale*

A anaplasmose bovina está amplamente distribuída nas áreas tropicais e subtropicais do mundo e é um dos principais problemas para a criação de bovinos em muitos países.

Nos Estados Unidos, a anaplasmose é enzoótica em todos os estados do Sudeste e em vários do Oeste e Centro-Oeste, no entanto, tem sido relatada em quase todo o território e sua distribuição pode ser ampliada devido ao aumento do transporte de bovinos e, conseqüentemente, pela oportunidade de transmissão mecânica entre bovinos assintomáticos persistentemente infectados (KOCAN et al., 2003). Esta enfermidade também é considerada endêmica em vários países das Américas Central e do Sul (GUGLIELMONE et al., 1995).

Bovinos infectados por *A. marginale* têm sido encontrados na Áustria (BAUMGARTNER et al., 1992), Itália (CRINGOLI et al., 2002), Espanha (DE LA FUENTE et al., 2004), Portugal (CAEIRO, 1999) e alguns países do leste europeu (KOCAN et al., 2003). Esta bactéria também possui relatos em países europeus as margens do Mediterrâneo (KOCAN

et al., 2010), Oriente Médio (MOLAD et al., 2006) e Ásia (LIU et al., 2005), além do continente africano (THEILER, 1910; TEMBUE et al., 2011, TEMBUE, 2012).

No Brasil, áreas de instabilidade ou estabilidade enzoótica ocorrem tanto em relação ao carrapato e quanto a anaplasnose. O primeiro é caracterizado por regiões onde as condições climáticas são desfavoráveis para o desenvolvimento do vetor biológico da riquetsia durante parte do ano, como sertão da Bahia, Pernambuco e Ceará (KESSLER et al., 1987). Como exemplo, em um levantamento realizado no estado de Sergipe, em regiões de clima árido, semi-árido, transição semi-árido e transição semi-úmido, foi observada média de prevalência de bovinos soropositivos de 16,30% para *A. marginale* (OLIVEIRA et al., 1992). As áreas de estabilidade enzoótica são aquelas onde o desenvolvimento do vetor ocorre durante todo o ano, devido a condições climáticas favoráveis (KESSLER, 2001), como a mesorregião do Norte Fluminense e do Médio Paraíba no estado do Rio de Janeiro (SOUZA, 2000, SOUZA et al., 2000), favorecendo a possibilidade de infecção continuada.

A dinâmica da infecção por hemoparasitos é dependente de fatores diversos, tais como a população de carrapatos infestantes, a capacidade de transmissão do carrapato, que pode estar correlacionado também a fase de desenvolvimento do artrópode, e a susceptibilidade dos bovinos, que pode variar com a raça, idade, escore nutricional e corpóreo, estado fisiológico e imunológico do indivíduo (SOARES et al., 2000).

Muitas circunstâncias levam à ocorrência de surtos de TPB, de acordo com Souza et al. (2000), Madruga et al. (2000), Vidotto e Marana (2001), o estudo epidemiológico da anaplasnose em bovinos numa determinada área, pode revelar a possibilidade ou não da ocorrência dos surtos. Esta possibilidade é avaliada segundo a situação epidemiológica que pode ser de estabilidade enzoótica, instabilidade e situação de área marginal.

Uma área de estabilidade pode se tornar instável devido a alguns procedimentos, provocando com isso uma baixa taxa de inoculação de agentes, e conseqüentemente baixa imunidade (D'ANDREA et al., 2006, SILVA, 2008).

Segundo Araújo et al. (1998), provas sorológicas são métodos adequados para se conhecer a situação epidemiológica da TPB, em particular a anaplasnose, e entre elas, o que confere melhores resultados é o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) indireto, quando comparado a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e outras técnicas.

Mahoney e Mirre (1971) declararam que, a maioria dos problemas no controle das babesioses nos rebanhos está relacionada com alterações na estabilidade do rebanho, e a medição do valor de inoculação é essencial para a avaliação do estado epizootiológico da população de hospedeiro. As medições envolvem a contagem de carrapatos nos hospedeiros e exame microscópico dos carrapatos para determinar o valor de infecções com babésias, porém são consideradas muito trabalhosas para a aplicação de rotina. Todavia, as condições nas quais os animais jovens adquirem a infecção também estão relacionadas ao valor de inoculação. Estes conceitos podem ser facilmente extrapolados para pesquisas envolvendo a anaplasnose em bovinos (ARAÚJO et al., 1998).

Estudo de Ribeiro e Reis (1981) sobre os aspectos epidemiológicos da anaplasnose bovina, em quatro regimes de manejo em Minas Gerais, indicaram que esta é uma doença de característica endêmica no Estado. Ao observar o curso natural da enfermidade em 13 bezerros criados semi-estabulados, verificou que todos se tornaram infectados em torno de 62 dias de idade. Os anticorpos colostrais persistiram por um período variável de 12 a 40 dias. Todos os animais apresentaram parasitemia, metade mostrou sintomas clínicos e curou-se naturalmente. As condições de manejo foram boas e os animais receberam aleitamento artificial e alimentação suplementar, o que favoreceu a superação da infecção.

A identificação de isolados geográficos não transmitidos por carrapatos tem influência no controle da anaplasnose. Em regiões onde estes isolados são endêmicos, o controle deve ser direcionado para prevenção da transmissão mecânica por fômites contaminados com

sangue infectado, insetos picadores e, em segundo plano, o combate aos vetores (DE LA FUENTE et al., 2001b).

A epidemiologia da anaplasmoze bovina envolve aspectos que ainda permanecem indefinidos, principalmente porque a transmissão de *A. marginale*, em condições naturais, não é bem determinada (GUGLIELMONE, 1995). *Anaplasma marginale* é o mais prevalente patógeno de bovinos transmitido por carrapatos em todo o mundo, ocorrendo em seis continentes e sendo responsável pela grave morbidade e mortalidade em regiões temperadas, subtropicais e tropicais (PALMER et al., 2000).

2.5 Aspectos da imunidade contra *A. marginale*

Os bezerros recém-natos são particularmente dependentes da ingestão de anticorpos maternos via colostro para que se estabeleça um bom equilíbrio na relação saúde x doença (PACHECO et al., 2004). De acordo com Tizard (2002), uma particularidade no caso de ruminantes é a placenta ser do tipo sindesmocorial, cujo epitélio coriônico fica em contato direto com os tecidos uterinos. Isto significa que ocorre bloqueio total da passagem de imunoglobulinas da mãe para o feto, fazendo com que o animal seja dependente dos anticorpos colostrais ao nascer.

Riek (1963) e Callow (1977) relataram que bezerros de todas as raças parecem possuir uma imunidade natural para hemoparasitos, e isto é reforçado por anticorpos colostrais circulantes em bezerros nascidos de vacas previamente infestadas. Nos bezerros que são infectados, seja por desafio natural ou imunização, até a idade de oito a nove meses, a reação à doença é mínima e o animal é efetivamente imunizado.

Anticorpos maternos para anaplasmoze em bezerros tendem a desaparecer depois de 9 a 12 meses (POTGIETER; STOLTZ, 1994). Entretanto, os bezerros permanecem resistentes mais tempo do que os anticorpos transferidos passivamente (POTGIETER; STOLTZ, 1994). Há animais que reagem gravemente quando a primo infecção ocorre na idade adulta, e a taxa de mortalidade pode ser alta dependendo da virulência e do volume de inoculação do organismo infectante (AUBRY; GEALE, 2011).

A imunidade contra *A. marginale* é de duração variável e em alguns casos pode até ser cíclica, ou seja, fica correlata ao ciclo do vetor artrópode (AUBRY; GEALE, 2011). Tem origem humoral e celular, pode ser desenvolvida após recuperação de infecção aguda natural ou pela imunização. Esta pode ser induzida e estimulada a partir de organismo vivos ou mortos, frações de membrana ou com proteínas de superfície purificadas que apresentam epítomos específicos para células B e T (TEBELE et al., 1991). A resposta imune contra *A. marginale*, requer a indução de uma resposta mediada por linfócitos T CD4+, produção de altos níveis de interferon gama (IFN- γ), ativação de macrófagos e estimulação de linfócitos B para produzirem altos níveis de anticorpos da classe IgG2 (ESTES et al., 1994, PALMER et al., 1999, BROWN et al., 1998). Sabe-se que estes anticorpos estão associados à resistência adquirida à infecção por *Anaplasma*, pois são direcionados contra os corpúsculos iniciais, com a função de neutralizar sua infectividade (PALMER; McGUIRRE, 1984). Assim, anticorpos direcionados contra epítomos B, presente na membrana externa destes corpúsculos, podem bloquear a invasão ou mediar mecanismos anticorpos dependentes que poderão resultar na morte deste parasito (CANTOR et al., 1993).

O fato da imunidade para anaplasmoze ser baseada na premunicação ou em uma infecção constante é importante, pois permite conhecer o *status* imune da população de bovinos em áreas enzoóticas e, com isto, traçar estratégias relacionadas ao controle e prevenção da anaplasmoze (MADRUGA et al., 2000).

Seis proteínas de superfície principais (MSPs) de *A. marginale*, derivadas de eritrócitos de bovinos parasitados, foram identificadas e consideradas conservadas em patógenos provenientes de carrapatos e cultura de tecidos. MSP1a, MSP4 e MSP5, são proteínas de genes

únicos e não variam antigenicamente durante a multiplicação do agente, portanto são mais estáveis para avaliar a resposta imune dos animais. Por sua vez, MSP1b, MSP2 e MSP3 são provenientes de famílias de multigenes e podem variar antigenicamente, principalmente em bovinos portadores de infecção crônica (BARBET et al., 2000, GUEDES JR et al., 2010).

MSP1 é um heterodímero composto de dois polipeptídios não relacionados estruturalmente: MSP1a e MSP1b. MSP1a é codificado por *msp1a* e está envolvido na adesão a eritrócitos bovinos e células de carrapatos, e transmissão de *A. marginale* por *Dermacentor* spp. (DE LA FUENTE et al., 2001b). MSP1b é codificado por pelo menos dois genes, *msp1β1* e *msp1β2* (BROWN et al., 2001) e foi sugerido ser uma adesina para eritrócitos bovinos mas provou-se não ser uma adesina para células de carrapato (DE LA FUENTE et al., 2001a). O peso molecular de MSP1a varia de tamanho entre isolados de *A. marginale* por causa de diferentes números de repetições em tandem de 29 aminoácidos (DE LA FUENTE et al., 2003).

A estrutura de MSP2 que é similar entre algumas espécies de *Anaplasma* pode ser responsável, em parte, pela proteção cruzada induzida pela vacinação por *A. centrale* (DE LA FUENTE; KOCAN, 2001)

Proteínas como MSP4 e MSP5 que são conservadas antigenicamente entre *A. marginale centrale* e *A. marginale*, também podem ser requeridas para mimetizar a proteção induzida pela vacina viva de *A. marginale centrale* ou pela imunização com membranas externas purificadas (MOLAD et al., 2006; DE LA FUENTE et al., 2005).

As proteínas de membrana MSP2 e MSP3 de *A. marginale*, são altamente variáveis durante a infecção, resultante de eventos de conversões sequenciais de genes que dão origem a variantes estruturais e antigênicas expressas de sítios únicos de expressão (ALLEMAN; BARBET, 1996; BRAYTON et al., 2005).

MSPs estão envolvidas em interações com hospedeiros vertebrados e invertebrados e, por este motivo, também parecem evoluir mais rapidamente do que outros genes nucleares, pois estão sujeitas a pressão de seleção exercida pelo sistema imune dos animais (DE LA FUENTE; KOCAN, 2001).

Noh et al. (2008) sugerem que a transição da bactéria do eritrócito para a célula do carrapato esteja acompanhada por remodelamento da superfície de *A. marginale*, diminuindo o número de proteínas nos complexos expressos na superfície das células de carrapato. As causas atribuídas a este fato são: a diminuição da expressão protéica, diminuição na exportação de proteínas para a superfície da bactéria, alteração na exibição ou disfarce das proteínas na superfície por outras moléculas.

Nos últimos anos, os estudos sobre imunização contra *Anaplasma* concentraram-se na obtenção de frações antigênicas. Bovinos imunizados com corpúsculos iniciais ou membrana destes apresentaram significativa redução da anemia e da riquetsemia (MONTENEGRO-JAMES et al., 1990; TEBELE et al., 1991; RODRIGUEZ et al., 2000).

A imunização de bovinos com as MSPs nativas e recombinantes de *A. marginale* induz uma proteção significativa contra anaplasmose aguda (PALMER et al. 1986; PALMER, 1999). Estas duas proteínas recombinantes (MSP3 e MSP5) mostraram potencial para uso em testes de diagnóstico (MCGUIRE et al., 1991).

O tamanho e consistência dos ciclos da doença sugerem que a recorrência da infecção esteja ligada à variação antigênica contínua pelo organismo, seguida de desenvolvimento de resposta imune primária pelo hospedeiro (ALLEMAN et al., 1997).

2.6 Diagnóstico de *A. marginale*

Além dos sinais clínicos, tais como febre, apatia, letargia, perda de peso e anemia, várias técnicas complementares têm sido utilizadas no diagnóstico de *A. marginale*.

Na fase aguda da doença, quando a riquetsemia é alta, corpúsculos de *Anaplasma* spp são detectados nos eritrócitos de bovinos, a partir de esfregaços sangüíneos corados (FARIAS, 1995), contudo, trata-se de um método pouco sensível e incapaz de detectar o parasita nos casos de baixos níveis de riquetsemia, predominante na fase crônica (KIESER et al., 1990, POTGIETER; STOLTSZ, 1994). Todorovic e Tellez (1975) enfatizaram que a identificação de hemoparasitos em esfregaço de sangue é evidência verdadeira de infecção, todavia, o exame microscópico negativo não a exclui. Atualmente, na fase inicial de infecção, em populações bovinas imunes e naquelas que tem sido terapêuticamente tratada, a detecção em esfregaços sangüíneos corados é escassa. A identificação pelo exame microscópico em esfregaço consome tempo e é cansativo, especialmente quando a maioria de esfregaços é negativa (SANTANA, 2000).

A concentração de riquetsias em animais cronicamente infectados dificulta o diagnóstico direto (PALMER et al., 1986), por este motivo, houve a necessidade de se desenvolver técnicas mais aprimoradas no diagnóstico de *Anaplasma* spp. Estes métodos apresentam grandes vantagens devido aos altos níveis de sensibilidade e especificidade (CORONA et al. 2000, KOCAN et al., 2010, AUBRY; GEALE, 2011).

2.6.1 Diagnóstico sorológico de *A. marginale*

Técnicas sorológicas foram desenvolvidas ao longo dos anos para o diagnóstico de anaplasmose tais como a fixação do complemento, aglutinação, imunofluorescência e imunoadsorção enzimática (PALMER et al., 1999). O diagnóstico indireto utilizado para pesquisa de anticorpos anti-*A. marginale* tem sido empregado em levantamentos epidemiológicos, possibilitando conhecer a proporção de animais portadores, o grau de proteção do rebanho e a faixa etária mais afetada, dados necessários para o estabelecimento de programas de controle desta riquetsiose (ARAÚJO et al., 1997).

A fixação de complemento (FC) é baseada em reações de anticorpos IgM, produzidos no momento da infecção primária (MAHONEY, 1964; BÖSE et al., 1995). A prova utiliza antígenos produzidos a partir de eritrócitos infectados, apresentando boa correlação com a prova de aglutinação em tubo e sensibilidade de 95 a 96%. Os reagentes empregados, complemento, sistema hemolítico e antígeno, são titulados para avaliar o grau de hemólise com diferenças nos títulos em isolados de cepas de *A. marginale* (MAHONEY, 1964).

As provas de aglutinação apresentam como princípio básico a reação de anticorpos bivalentes e antígenos polivalentes, com formação de compostos macromoleculares visíveis. As variações dessas provas incluem aglutinação em tubo capilar, aglutinação rápida e congutinação rápida (TCR). Na prova de aglutinação em tubo capilar, a reação positiva é identificada pela formação de grumos suspensos, irregularmente distribuídos no tubo capilar (RISTIC, 1962). A prova de aglutinação rápida (AMERAULT; ROBY, 1968) foi utilizada, inicialmente, como prova de campo, e mais tarde incluído o fator sérico bovino para controlar as reações falso-negativas, o que contribuiu para aumentar a sensibilidade no diagnóstico de anticorpos anti-*A. marginale*. O fator sérico bovino fornece o complemento e a congutina, proteína existente no soro de ruminantes, que são responsáveis pela reação de congutinação (ROSE et al., 1978).

No teste de imunofluorescência indireta (IFI), são utilizados como antígenos esfregaços sangüíneos com eritrócitos infectados (MADRUGA et al., 1985). Os anticorpos IgG, presentes no soro teste, reagem com o antígeno, sendo identificados por anticorpos anti-IgG bovina marcados com isotiocianato de fluoresceína (conjugado). Esse teste apresenta boa sensibilidade, porem diferentes níveis de fluorescência, fluorescências inespecíficas, e subjetividade do operador, são alguns inconvenientes apresentados pelo teste, que têm dificultado a sua padronização (BÖSE et al., 1995).

Nos testes de imunoadsorção enzimática (ELISA), as reações antígeno-anticorpo são detectadas por meio da conjugação de um destes componentes com uma enzima, que posteriormente age sobre um substrato, produzindo uma coloração que pode ser detectada visualmente, mas sua validade é mensurada por espectrofotometria (MADRUGA et al., 2001). Este é um método muito utilizado, pois permite o processamento de várias amostras ao mesmo tempo, são mais rápidos que os testes citados anteriormente e é realizado, em parte, de forma automatizada evitando problemas com interpretação duvidosa, comum nos testes de imunofluorescência (MADRUGA et al., 2000). Knowles et al. (1996) desenvolveu um ELISA por competição (cELISA) para detecção de anticorpos anti-*A. marginale*, o mesmo utiliza como antígeno a proteína recombinante de 19 kDa do *A. marginale* (MSP5) e o anticorpo monoclonal ANAF16C1 ligado à peroxidase como conjugado.

Diversos estudos epidemiológicos foram realizados utilizando o teste cELISA. Torione de Echaide et al. (1998) encontraram 96 e 95% de sensibilidade e especificidade respectivamente, em seu trabalho sobre a detecção de anticorpos anti-*A. marginale* utilizando cELISA. Mais recentemente um cELISA foi padronizado com a proteína recombinante de superfície (rMSP5) como antígeno, clonada a partir do gene MSP5 do isolado PR1 de *A. marginale* no estado do Paraná, este método apresentou 96,7% de especificidade e 98,9 de sensibilidade (MARANA et al. 2009). Foi encontrada uma prevalência de anticorpos contra *A. marginale* de 58,74% em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná utilizando cELISA (MARANA et al. 2009).

O teste ELISA indireto (iELISA), utilizando antígeno bruto purificado ou antígeno recombinante baseado em proteínas principais de superfície (MSP), foi utilizado por Silva (2008), Guedes Jr et al. (2008), Guedes Jr (2006), Silva (2012) e Tembue et al. (2011) para detecção de anticorpos IgG anti-*A. marginale* com o objetivo de determinar o estado epidemiológico de diferentes regiões do Brasil e, no último estudo, em Moçambique.

Marana et al. (2006) comparando IFI, TCR, iELISA e cELISA para a detecção de anticorpos anti-*A. marginale* em soros de bovinos de diferentes áreas enzoóticas, observaram 75% de concordância entre iELISA e TCR, 76,6% entre ELISA e IFI e 75,9% entre IFI e TCR. Ainda neste estudo o coeficiente kappa (k) apresentou melhor concordância (substancial) entre o iELISA e o cELISA, com $k = 0,77$, e índice k para IFI e TCR variando entre 0,58 e 0,49 (concordância moderada), respectivamente, ao serem analisados frente ao cELISA, evidenciando inferioridade destes testes em relação às duas variações de ELISA.

2.6.2 Diagnóstico molecular de *A. marginale*

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica para amplificação *in vitro* de sequências específicas de ácido desoxiribonucléico (DNA), altamente sensível, desenvolvida para detectar pequenas quantidades de DNA de diferentes agentes em amostras de sangue ou tecidos (VIDOTTO; MARANA, 2001). Pode ser empregada na pesquisa de hemoparasitas em bovinos e em artrópodes nos diversos estágios de desenvolvimento (STICH et al., 1993). Esta é uma técnica considerada sensível e é muito utilizada em laboratórios no diagnóstico das mais diversas doenças e também estudos epidemiológicos.

Ao longo dos anos diversas modificações foram feitas na PCR a fim de aumentar a sensibilidade desta técnica. Uma delas foi a introdução de uma segunda reação de amplificação do DNA a partir do produto da primeira reação utilizando iniciadores internos, denominando-a de nested PCR (nPCR) (MIYAZAKI et al. 1993). Essa técnica utiliza duas PCRs consecutivas melhorando a sensibilidade da técnica original. Uma nPCR para detecção de *A. marginale*, descrita por Torioni de Echaide et al. (1998), detectou 30 eritrócitos infectados/mL sangue, o que corresponde a um aumento de 10 a 100 vezes na sensibilidade com relação a PCR convencional.

O desenvolvimento de outras metodologias a partir da técnica PCR resultou numa inovação tecnológica, a PCR em tempo real, que vem ganhando espaço e aceitação nos laboratórios especializados em diagnóstico clínico e pesquisa científica por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos (KIM et al., 2007). A técnica permite o acompanhamento de todas as etapas da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, quando comparado com a PCR convencional, que é capaz de gerar diretamente resultados qualitativos, além de processamento pós-PCR, como a eletroforese. Na PCR em tempo real são geradas curvas na fase exponencial da reação, refletindo a diferença em suas quantidades iniciais de moléculas molde. Esta diferença é quantificada pela comparação do número de ciclos de amplificação necessário para que uma amostra atinja um limiar de sinal de fluorescência, este limiar é denominado Cycle threshold (Ct) (KUBISTA et al., 2006).

Carelli et al. (2007), desenvolveram uma PCR em tempo real baseado no método *TaqMan*, com oligonucleotídeos iniciadores para o gene MSP1b, para o diagnóstico da infecção por *A. marginale* em bovinos. O ensaio provou ser altamente específico, pois nenhuma reação cruzada foi observada com outras espécies *Anaplasma*, e seu limite de detecção foi de 10 cópias de DNA em 10 µl de DNA *template*. Resultados semelhantes foram encontrados por Decaro et al. (2008), que desenvolveram uma PCR em tempo real multiplex para a detecção e quantificação simultânea de DNA de *A. marginale* e *A. centrale* em amostras de sangue bovino utilizando sondas *TaqMan* e oligonucleotídeos iniciadores para os genes MSP1b e groEL respectivamente. O ensaio foi capaz de detectar 10 cópias de DNA de *A. marginale* e 100 cópias de DNA *A. centrale* em 10 µl de DNA *template*, com boa especificidade e reprodutibilidade.

Bacanelli et al. (2008), comparando PCR convencional e PCR em tempo real no estudo de *A. marginale* em bovinos naturalmente infectados, mostram que a segunda técnica detectou mais precocemente a infecção por *A. marginale*, reforçando sua sensibilidade. O estudo permitiu identificar 87 animais positivos e sete animais negativos em ambas as técnicas, o que resultou em uma concordância de 94,9% com índice kappa de 0,87. Permitiu ainda, demonstrar uma alta especificidade e uma maior sensibilidade em relação ao método convencional.

O diagnóstico baseado na hibridação de ácidos nucléicos e PCR são eficazes na detecção de *Anaplasma* spp. Sondas, contendo fragmentos de genes que codificam antígenos de superfície de *A. marginale*, foram desenvolvidas para a detecção de DNA dessa riquetsia em eritrócitos de bovinos e carrapatos infectados. As sondas podem ser utilizadas para determinar infecção de várias espécies de carrapatos por isolados de *A. marginale*, prevalência e incidência de carrapatos infectados em áreas enzoóticas, relação entre carrapatos infectados e surtos da doença (GOFF et al., 1988). Sondas de RNA foram desenvolvidas para detecção e quantificação de baixos níveis de riquetsemia, indetectáveis microscopicamente, identificando portadores crônicos de anaplamose. É uma prova específica, capaz de detectar até 0,01 ng de DNA genômico (ERIKS et al. 1993).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

As coletas a campo foram conduzidas entre outubro de 2009 e setembro de 2010, no setor de bovinocultura de leite da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO), Centro Estadual de Pesquisa em Agricultura Orgânica (Seropédica-RJ), antiga Estação Experimental de Seropédica, localizada na microrregião metropolitana da cidade do Rio de Janeiro (latitude sul 22° 48', longitude oeste 43° 41', altitude de 33m).

De acordo com a classificação de Köppen (KÖPPEN; GEIGER, 1928), o clima da região pertence à classe Aw, com inverno seco e verão chuvoso e quente, temperatura média de 24 °C, precipitação anual de 1300mm e umidade relativa do ar de 70,4%. A região tem duas estações climáticas definidas, com precipitação média no período chuvoso (outubro – março) de 979 mm e no período seco (abril – setembro) de 328 mm.

3.2 Animais

Um total de 41 bezerras com idade entre 01 e 180 dias foram utilizadas, sendo 21 nascidas durante o período chuvoso (grupo A) e 20 ao seco (grupo B). Como a PESAGRO-RIO realiza um trabalho de melhoramento genético do plantel bovino há mais de vinte e cinco anos, o rebanho apresentava características distintas quanto ao padrão racial, havia animais mestiços F1 (*Bos taurus* x *B. indicus*) e girolandos ($\frac{5}{8}$ *B. taurus* x $\frac{3}{8}$ *B. indicus*). Durante o período de outubro de 2009 e setembro de 2010, foram coletados um total de 1607 soros dos 41 animais, sendo um total de 822 do grupo A e 785 do B. Os detalhamentos das coletas estão descritos no item 3.5.

Os animais foram mantidos em galpão de alvenaria sem proteção por telas até o 30º dia de vida. Acesso a uma área de 0,5 ha de pastagem do 30º até o 60º dia. Do 60º até aproximadamente o 120º dias de vida, os animais foram mantidos em uma área de 1,5 ha em sistema de baía coletiva e após este período foram transferidos para uma área de 3,0 ha, distante ao menos 1 Km do local de nascimento.

3.3 Manejo nutricional

As bezerras permaneceram em sistema de baias de alvenaria sem telas nos primeiros 30 dias de vida, onde recebiam 4 kg de leite por dia, em dois arraçoamentos. Neste período, após o primeiro aleitamento do dia em baias individuais, os animais eram deslocados a uma baía coletiva coberta sem acesso a pastagem, e ao fim do dia retornavam ao sistema individual destaca-se que a partir de 15 dias ficou disponível para esta idade ração concentrada e água a vontade.

Cabe ressaltar que nos primeiros dias de vida os bezerros ingeriram colostro de suas respectivas progenitoras. Nas primeiras horas foi fornecido naturalmente pela vaca, pois permaneciam a campo por pelo menos 24 horas, e depois foram forçados aos animais em suas respectivas baias, por no mínimo 5 dias.

A partir do 30º dia, após a alimentação da manhã, os animais eram soltos em um piquete de 0,5 ha, composto por capim *Brachiaria humidicula*, onde permaneciam até o dia seguinte.

Entre 60 e 120 dias este rebanho foi mantido em piquete de 1,5 ha constituído também por *B. humidicula*, indo à baía somente para aleitamento, quando necessário. Cabe ressaltar que o desmame ocorreu de forma gradativa em relação à idade, ou seja, depois de 30 dias os animais só recebiam aleitamento uma vez por dia, porém, somente após 90 dias foi total, devido a grande oferta de leite da produção da fazenda, por dificuldade de comercialização.

Após 120 dias de idade, os animais foram transferidos para uma área de 3,0 ha, composta por *B. decumbens* e *Panicum maximum*, distante cerca de 1 km do setor de nascimento. Água a

vontade e ração concentrada uma vez ao dia foram fornecidas em todos os ambientes, respeitando a necessidade nutricional de cada faixa etária.

3.4 Manejo sanitário

O sistema de controle de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* adotado foi o tratamento com Ivermectina 1 mg/kg, que também foi eficaz para prevenir surtos de helmintoses gastrointestinais. Este tratamento ocorria diante de situações em que altos níveis de infestação por carrapatos eram detectados.

Vacinas para Febre Aftosa foram realizadas durante o período determinado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e executados em conjunto com o Sistema de Defesa Sanitária do município de Seropédica.

O controle de anaplasmose, bem como de babesiose, a base de quimioterápicos não foi necessário, pois o monitoramento mais refinado de possíveis infecções e casos clínicos foram realizados pelo estudo.

Antes do acompanhamento proposto para propriedade, o controle de hemoparasitos preconizado era o tratamento profilático dos animais. Este método ocorria da seguinte forma, no primeiro dia de pastejo, entre 15 e 30 dias de idade, os bezerros recebiam uma subdosagem de antibiótico oxitetraciclina (100 mg/animal ou 2,5 mg/kg) e outra de dipropionato de imidocarb (2,1 mg/kg), esta dosagem era repetida após 30 dias, a fim de evitar a provável doença clínica, tanto por *Anaplasma* quanto por *Babesia*, respectivamente. Este tratamento além de não ser apropriado, ainda trazia muitos prejuízos tanto a nível econômico quanto biológico, pois gerava um consumo financeiro desnecessário com medicamentos e ainda torna suscetível ao surgimento de cepas resistentes aos fármacos.

3.5 Delineamento experimental

O fato de a propriedade adotar um sistema de inseminação artificial programado, com estações de nascimentos pré-definidas, permitiram o acompanhamento de dois grupos de animais, um nascido no período de outubro a dezembro de 2009 e outro de abril a junho de 2010. As bezerras foram separadas em 04 grupos, sendo o primeiro com idade até 30 dias, o segundo entre 30 e 60, o terceiro entre 60 e 120 e o quarto de 120 a 180 dias. Os mesmos indivíduos migraram nos grupos de acordo com a idade. Esta divisão foi baseada no manejo zootécnico adotado pela propriedade no período. Todos os animais eram mantidos em locais destinados a bezerros desde o nascimento até completarem idade limite, sendo subdividido em galpão de alvenaria isolado de pasto e sem tela de proteção contra vetores artrópodes, um piquete coletivo para bezerros mantidos exclusivamente em aleitamento artificial, um para bezerros desmamados e alimentados com ração comercial (ou farelo de milho ou soja) e pasto, e outro para os demais, criados de modo extensivo. O pasto era composto predominantemente por *B. decumbens* consorciado com leguminosas.

As coletas ocorreram de outubro de 2009 a setembro de 2010, e quanto ao intervalo entre elas, este foi estabelecido a fim de estreitar a detecção da primo-infecção por *A. marginale* bem como sua relação com a primo-infestação por *R. microplus* e a resposta sorológica ao *A. marginale*. Amostras de sangue venoso foram obtidas, de cada um dos bezerros individualmente, em frascos contendo anticoagulante EDTA a 10%, destinados à extração de DNA e pesquisa de *A. marginale*, e frascos sem anticoagulante à pesquisa sorológica, ambos à vácuo e de modo asséptico.

As coletas ocorreram em média, a cada três dias até que os animais completassem 90 dias, intervalos de 7 dias por até 150 dias e por fim intervalos a cada 15 dias até que os animais completassem os 180 dias de vida.

Para desenvolvimento da pesquisa, não houve interferência no sistema de manejo adotado pela instituição, os animais foram tratados para diminuição de carrapatos e verminoses, a fim de evitar prejuízos em decorrência de situações de hiperparasitismo, de acordo com critérios e rotinas adotados pelo responsável técnico da propriedade. A única excessão se deu em relação ao tratamento profilático, pois não houveram intervenções terapêuticas para controle da anaplasmose e babesiose.

Sempre existiu a preocupação em observar o aspecto clínico geral dos animais e compará-los com a situação de normalidade, correlacionando quadros clínicos relevantes com os dados obtidos. Observações quanto à sanidade foram feitas semanalmente e sempre que solicitado.

3.6 Ensaio de imunoabsorção enzimática indireto (iELISA) para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale*

O antígeno de *A. marginale* foi gentilmente cedido pela prof^a. Dra. Rosângela Zacarias Machado, Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Estadual Paulista (Unesp-Jaboticabal). Este antígeno bruto, baseado em proteínas principais de superfície (MSPs), foi produzido a partir de amostras de *A. marginale* isolados de bezerros com alta riquetsemia, oriundos de Jaboticabal, São Paulo, por Machado (1995, dados não publicados). A referida cepa foi mantida por sucessivas passagens em bezerros esplenectomizados e criopreservada em Dimetil Sulfoxido 10% (DMSO 10%) a -196 °C.

O antígeno total utilizado apresentava concentração proteica de 1435µg/ml, sendo conservado em freezer -80^oC até o momento dos testes.

Os controles positivos foram produzidos a partir de animais experimentalmente infectados e confirmadamente positivos no exame direto (esfregaço sanguíneo), molecular (PCR) e acompanhamento sorológico (iELISA). Os soros negativos foram obtidos de bezerros recém-nascidos antes da ingestão do colostro, sendo sua negatividade comprovada pelas mesmas técnicas para controles positivos.

Para detecção e avaliação da resposta imune humoral dos animais naturalmente infectados por *A. marginale*, 1607 amostras de soro sanguíneo foram submetidas ao iELISA descrito por Machado et al. (1997) adaptado para *A. marginale* (Anexo A). As soluções utilizadas encontram-se no anexo B.

O iELISA foi estabelecido por titulação em blocos, à concentração ótima do antígeno de 12µg/mL. A diluição única do ensaio foi de 1:200 para os soros de referência positiva, negativa e soros-testes, o conjugado foi utilizado na diluição de 1:25000. Nessas condições, a menor densidade óptica (DO) média dos soros negativos (n=18) foi de 0,117±0,004. A maior reatividade média verificada para os soros de referência positiva (n=18) foi de 1,006±0,251. O ponto de corte foi estabelecido de acordo com a escala de nível do iELISA (NE) definido por Machado et al. (1997), ou seja, os níveis de anticorpos de valor diagnóstico (NE ≥ 3) foram considerados positivos.

A densidade óptica (DO) corrigida de cada amostra teste foi calculada de acordo com a equação abaixo (MACHADO et al., 1997).

$$DOc = \frac{DO \text{ amostra} - \bar{X} DO \text{ controles negativos}}{\bar{X} DO \text{ controles positivos} - \bar{X} DO \text{ controles negativos}}$$

As amostras testes foram classificadas como positivas quando sua DO foi 2,5 vezes superior a média das DOs dos controles negativos.

As amostras foram agrupadas em níveis de IELISA (NE), que variaram de 0 (nível mais baixo) a 9 (nível mais alto). A amplitude máxima dos NE zero foi determinada pela

média dos valores em absorbância de soro de animais não imunes contra *A. marginale* (soro de referência negativa), acrescido de dois desvios padrão da média correspondente. A partir deste limite, os intervalos entre os outros níveis de iELISA foram acrescidos de 35% cada (MACHADO et al., 1997). Animais com DOs acima de 0,292 ($NE \geq 3$) foram considerados positivos.

Para efeito de classificação epidemiológica de áreas, foram utilizados os critérios estabelecidos por Mahoney e Ross (1972), que caracterizaram como estabilidade enzoótica as áreas cujos rebanhos possuem frequência de anticorpos acima de 75%, áreas de instabilidade enzoótica as com frequência inferior a 75%, e áreas marginais àquelas que estão muito próximas ao limite.

3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *A. marginale*

A extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) foi realizada a partir das amostras com sangue total contendo EDTA 10%, utilizando o protocolo descrito por Sambrook et al. (1989) com modificações (Anexo C).

A concentração do DNA obtido de cada amostra foi em média 60 ng/ μ L, tal mensuração foi obtida por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop[®] 2000, em seguida o material foi acondicionado em temperatura abaixo de 4°C até a realização dos testes moleculares.

O sangue para a obtenção do DNA controle positivo para *A. marginale*, foi produzido por inoculação experimental em bezerro esplenectomizado, no Laboratório de Protozoologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro.

A sensibilidade analítica da PCR para *A. marginale* foi determinada por meio de diluições seriadas do DNA de um animal com parasitemia pré-determinada. Foram feitos esfregaços sanguíneos em lâminas, com sangue provenientes de vasos de pequeno calibre da extremidade das orelhas, e contagem do número total de hemácias em câmara Neubauer. A lâmina foi submetida à microscopia óptica e uma média do número de hemácias por campo foi estabelecida. Em seguida, o percentual de bacteremia foi determinado, baseado na contagem de corpúsculos por campo. Considerando o resultado da hematimetria total, fez-se uma estimativa do número de riquetsias por microlitro (μ L) de sangue.

A partir do valor da riquetsemia, do volume inicial de sangue utilizado para extração de DNA (200 μ L), do volume de DNA ao final da extração (120 μ L) e do volume inicial de DNA utilizado para fazer a reação de sensibilidade da PCR (4 μ L), foi estimado a capacidade de detecção da técnica por meio de diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) do DNA positivo em água ultrapura (*Treated water pyrogen free*, DNase/RNase free) para se determinar até que concentração poderia ser detectado o DNA do agente. (Apêndice I)

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados foram sintetizados, pela Invitrogen[™], para identificar o gene que codifica a proteína principal de superfície 5 (*msp5*), cepa norte-americana de *A. marginale* - Florida (GenBank nº M93392), e produziram um fragmento específico de 458 pares de bases (TORIONI de ECHAIDE et al., 1998).

Primers { *msp5* F (5'- GCA TAG CCT CCG CGT CTT TC-3')

(produto - 458pb) { *msp5* R (5'- TCC TCG CCT TGC CCC TCA GA-3')

O protocolo da PCR do fragmento do gene MSP5 para *A. marginale*, foi adaptado daquele descrito por Torioni de Echaide et al. (1998) em um volume final de 20 μ L. Respeitando-se os ajustes de concentração para o volume final, empregou-se a seguinte mistura (mix) em todas as reações: 1 parte (4 μ L) de Tampão 5x Green Flexi[®] (Promega[™], cat. M891A), 3.0 mM de MgCl₂, 0,4mM de cada DNTp, 0,5 U de Taq DNA polimerase

(Invitrogen™, cat. 10342-020), 0,6 µM de cada *primer* e 4µL de cada amostra de DNA teste (média da concentração inicial de 60 ng/µL) e água ultra pura (Ambrion®) q.s.p. (ANEXO D)

No teste da sensibilidade para a PCR de *A. marginale* este mix foi utilizado e a intensidade das bandas apresentou um decréscimo regressivo conforme a concentração do DNA positivo foi diminuindo durante as diluições seriadas, indicando uma capacidade de detecção na ordem de 1,0 fentograma de DNA/µL.

Em relação às condições de ciclagem, fez-se uso das mesmas utilizadas no protocolo original descrito por Torioni de Echaide et al. (1998). As amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 58 segundos (amplificação do gene alvo) e extensão a 72°C por 30 segundos e, por fim, uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os ciclos de amplificação foram realizados no termociclador modelo Veriti® 96-well Thermal Cycler da Applied Biosystems™.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%, contendo SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies™), em tampão de corrida 0,5x TBE (40mM Tris, xxmM Ácido Bórico e 2mM EDTA pH 8,0) e marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas™). Um volume de 10µL de cada amostra foi aplicado em cada coluna do gel e a corrida eletroforética foi realizada a uma corrente de 100mA por 45minutos (2,3 volts/cm²). Os produtos da PCR foram visualizados e fotografados em transluminador de luz ultravioleta, acoplado a um analisador de imagens (Sistema de Fotodocumentação L-Pix HE – Loccus Biotecnologia®).

Como critério de escolha, baseado nos resultados do iELISA, foram avaliados para amplificação do gene MSP5 de *A. marginale* pela PCR apenas os animais do grupo A.

3.8 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados, as amostras dos animais foram agrupadas em diferentes categorias. Inicialmente foi realizada análise exploratória dos dados, sendo calculada a frequência de soropositivos para cada grupo etário. Posteriormente os dados foram submetidos ao teste de Spearman para verificar a existência de interação entre as variáveis.

Para avaliar a associação entre a variável frequência de animais soropositivos para *A. marginale* e o fator idade, os dados foram submetidos ao teste de qui-quadrado (χ^2) e, em seguida, para fator de risco, foi realizada uma análise dicotomizada através da odds ratio (OD).

Todos os procedimentos operacionais foram realizados com o auxílio do software estatístico R (Foundation for Statistical Computing), version 2.12.2 (2011). Os gráficos foram preparados através do software estatístico Graph Pad (Prism®) versão 4.0 (2003), ambos em versões gratuitas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os soros testados foram dispostos em um único conjunto quando comparado para estação de nascimento, pois não houve diferença significativa entre os grupos A (período chuvoso) e B (seco) (Tabela1), ou seja, no período estudado não houve diferença entre a resposta mediada por IgG anti-*A. marginale* para os bezerros nascidos nos dois períodos, o que corrobora Silva (2008) e Silva (2012). Tais estudos indicam não haver estatística significativa ($p>0,05$) entre as respostas sorológicas para as faixas etárias nascidas ao longo de todo ano na mesma região endêmica para *A. marginale* e sob os efeitos do mesmo clima, em que ocorre infestação persistente por todos os meses do ano.

A menor densidade óptica (DO) média dos soros controles negativo ($n=18$) foi de $0,117\pm 0,004$ e a maior absorvância média verificada para os soros controles positivo ($n=18$) foi de $1,006\pm 0,251$. Assim, baseado na média da absorvância dos soros controles negativo, foi estabelecido o primeiro nível de iELISA (NE) (0), sendo os demais níveis determinados pelo acréscimo de 35% sobre o nível anterior (Tabela 1). As amostras foram agrupadas em NE, que variaram de 0 (nível mais baixo) a 9 (nível mais alto) (MACHADO et al., 1997) e amostras com DO acima de 0,292 ($NE \geq 3$) foram consideradas positivas.

Tabela 1. Classificação estimada dos soros testes de bezerros recém-nascidos na Baixada Fluminense-RJ, em NE (Níveis de iELISA) variando na faixa de 0-9 de acordo com a densidade óptica (DO) e número de soros por grupo de estudo, testados por iELISA anti-*Anaplasma marginale*, durante o período de 2009-2010.

| NE | S/P | Grupo A (n=822)* | Grupo B (n=785)* |
|----|---------------|------------------|------------------|
| 0 | 0.0 - 0.140 | 183 | 190 |
| 1 | 0.141 - 0.189 | 150 | 159 |
| 2 | 0.190 - 0.256 | 160 | 160 |
| 3 | 0.257 - 0.346 | 139 | 111 |
| 4 | 0.347 - 0.468 | 86 | 80 |
| 5 | 0.469 - 0.633 | 60 | 54 |
| 6 | 0.634 - 0.855 | 33 | 26 |
| 7 | 0.856 - 1.155 | 10 | 4 |
| 8 | 1.156 - 1.560 | 1 | 1 |
| 9 | > 1.560 | 0 | 0 |

NE = Níveis de Elisa; S/P = Absorvância das amostras e dos soros de referência positiva; n=número de soros testados; grupo A = estação chuvosa; grupo B = estação seca * não há diferença estatística significativa ($p>0,05$).

Tabela 2: Percentual de amostras de soro em cada grupo experimental de faixas etárias, testados por iELISA anti-*Anaplasma marginale* e classificadas em Níveis de ELISA (NE), durante o período de 2009-2010.

| NE | < 30 dias | 30-60 dias | 60-120 dias | 120-180 dias | Total |
|----|-----------|------------|-------------|--------------|-------|
| 0 | 12,9 | 22,7 | 35,3 | 13,3 | 23,2 |
| 1 | 14,6 | 25,3 | 17,5 | 20,7 | 19,2 |
| 2 | 23,4 | 21,2 | 14,8 | 24,0 | 19,9 |
| 3 | 23,4 | 13,4 | 10,1 | 19,2 | 15,6 |
| 4 | 14,9 | 10,5 | 7,5 | 10,4 | 10,3 |
| 5 | 7,3 | 4,4 | 8,6 | 7,1 | 7,1 |
| 6 | 3,5 | 2,3 | 4,1 | 4,4 | 3,7 |
| 7 | 0,0 | 0,3 | 1,9 | 0,6 | 0,9 |
| 8 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,3 | 0,1 |
| 9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

De acordo com as amostras de soro avaliadas pelo iELISA (Tabela 2), 1,0% (16/1607) apresentou DO alta (NE = 7, 8 e 9) e 23,2% (373/1607) corresponderam ao NE mais baixo (NE = 0).

Em relação à faixa etária, 50,9% dos soros de animais até 30 dias, 69,2% entre 30-60 dias, 67,6% daqueles entre 60-120 dias e 58% dos acima de 120 dias estavam com NE negativo (0-2), inclusive 63,3% de amostras desde o nascimento até 180 dias, o que significa uma baixa taxa de resposta sorológica anti-*A. marginale* (PACHECO et al., 2004) ou mesmo a possibilidade de uma cepa pouco virulenta com baixo estímulo imunológico (KANO et al., 2002), potencial risco para anaplasnose clínica na propriedade.

Encontrou-se uma prevalência de anticorpos anti-*A. marginale* de 58,74% em bovinos adultos da região Centro-Sul do estado do Paraná utilizando cELISA (MARANA et al. 2009). Os 58,74% de prevalência, encontrados no trabalho, mostraram que, no ambiente subtropical da região Centro-Sul do estado do Paraná, a prevalência da anaplasnose bovina apresentou oscilação, mostrando valores mais baixos quando comparados àqueles de regiões mais quentes do estado. Este fator está, segundo o autor, diretamente relacionado às oscilações de temperatura da região, o que pode influenciar diretamente na população do carrapato *R. microplus*, principalmente no número de suas gerações, e conseqüentemente na taxa de inoculação dos agentes por ele transmitidos.

Mais de 30% das amostras de soro de bezerros com idade até 30 e de 30 a 60 dias apresentaram resposta entre NE 3-6, ou seja, entre o nascimento e os 60 dias há evidências de um contato com *A. marginale*. Este fato pode ser justificado porque as imunoglobulinas clostrais de ruminantes apresentam níveis elevados após 24 horas do parto e possuem meia-vida entre 11,5 e 16 dias (BARRINGTON; PARISH, 2001), indicando uma possível transferência passiva de IgG e também uma resposta do próprio animal à infecção pelo agente nos primeiros dias de vida.

Pacheco et al. (2004) diagnosticaram níveis de imunoglobulinas diminuídos no soro das vacas próximo ao período do parto, e nos bezerros mantidos em manejos semelhantes ao presente estudo. Estes autores observaram a diminuição gradativa a partir do primeiro dia de vida até 45 dias, o que corrobora os resultados sorológicos negativos dos animais desta faixa etária (Tabela 2), mesmo a propriedade situada numa área endêmica.

Os bezerros recém-nascidos já são capazes de manifestar resposta imune inata e adquirida mesmo com barreira placentária impedindo a passagem materno-fetal de anticorpos, esta resposta primária é lenta e a quantidade de anticorpos produzida é menor em comparação com animais adultos (RIET-CORREA et al., 2001). Para melhor suporte ao sistema imune em formação, a assistência imunológica materna através do colostro é sempre essencial (PALMER; MCGUIRE, 1984). Relatos indicam que o colostro fornecido aos bezerros possuem uma quantidade de anticorpos IgG anti-*A. marginale* suficiente para uma primeira ação imune (BARRINGTON; PARISH, 2001).

No presente estudo foi evidenciado o fornecimento deste aleitamento especial, rico em anticorpos, para todos os animais ao nascer e durante aproximadamente 5 dias após o nascimento.

O soro dos animais com idade 60 – 120 dias indicam uma maior prevalência (206/344) em NE igual a zero (Figura 1 e Tabela 3). A queda nos níveis de anticorpos colostrais atingindo valores não detectáveis (NE = 0) ao redor de 60 dias corrobora Pacheco et al. (2004). Numa análise isolada, esta faixa etária encontra-se epidemiologicamente numa situação de instabilidade enzoótica, o que poderia favorecer o surgimento de quadros clínicos da anaplasmose, fato este não evidenciado no estudo.

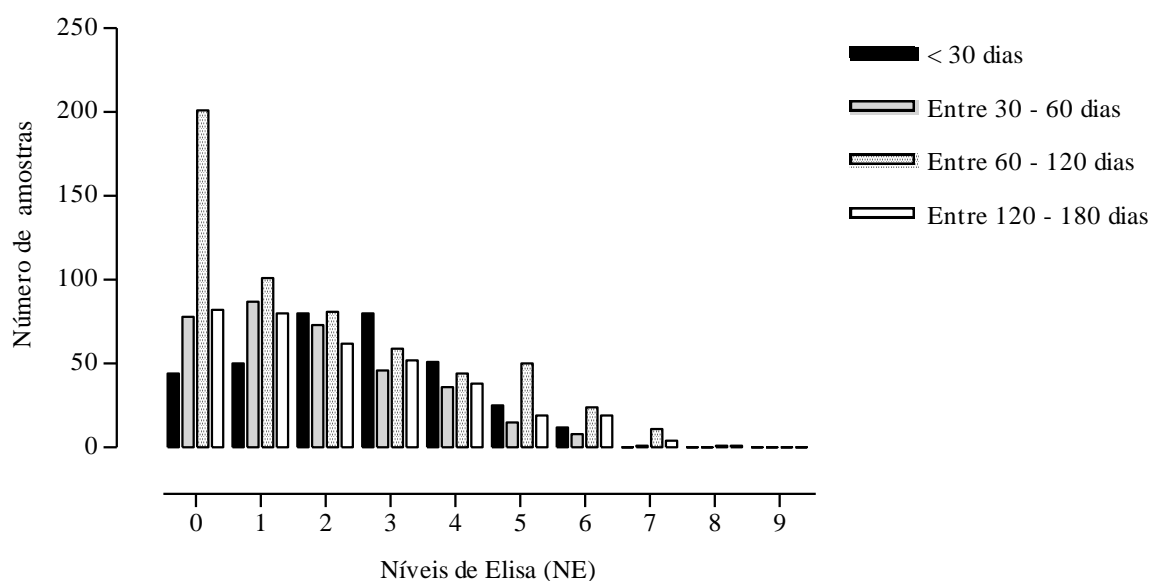


Figura 1. Número de amostras de soro de bezerros até 180 dias em uma propriedade da Baixada Fluminense-RJ, testados por iELISA anti-*Anaplasma marginale* e classificadas em Níveis de ELISA (NE), durante o período de 2009-2010.

Tabela 3. Frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* por faixa etária, em relação a quantidade de soro de bezerros até 180 dias em uma propriedade da Baixada Fluminense-RJ.

| Idade | Número de soros | Prevalência |
|---------------|-----------------|-------------|
| < 30 dias | 342 | 39,8 % |
| 30 - 60 dias | 344 | 23,3 % |
| 60 - 120 dias | 583 | 27,3 % |
| 120 -180 dias | 338 | 38,2 % |
| 01 - 180 dias | 1607 | 31,4% |

Durante os primeiros 180 dias de vida a frequência de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale* foi baixa (31,4%), caracterizando toda esta fase como de risco para a ocorrência de anaplasmose clínica (Tabela 3).

Analisando a tabela 4, os soros de animais entre 30 e 60 dias de idade apresentaram maior risco para anaplasmose (RP=1,9). Posteriormente, os dos animais com idade entre 60 - 120 e 120 - 180 dias apresentaram, respectivamente, 76% e 55% mais risco de serem soronegativos para *A. marginale* do que aqueles animais recém-nascidos, o que corrobora Pacheco et al. (2004) que descreveram na idade de 45 dias todos os animais com resultados sorológico negativo e a partir de 60 dias os níveis séricos de IgG voltam a aumentar.

Tabela 4. Avaliação da idade como fator de risco para a frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* pelo teste qui-quadrado em bezerros até 180 dias em uma propriedade da Baixada Fluminense-RJ.

| Fator de risco | N | P(%) | χ^2 | RP | P-valor | IC95% |
|--------------------|-----|--------|----------|------|---------|---------------|
| Idade | | | | | | |
| (1) < 30 dias* | 342 | 39,8 % | - | - | - | - |
| (2) 30 - 60 dias | 344 | 23,3 % | 16,8 | 1,90 | 0,03 | [0,47 – 0,93] |
| (3) 60 - 120 dias | 583 | 27,3 % | 9,4 | 1,76 | 0,04 | [0,74 – 0,87] |
| (4) 120 - 180 dias | 338 | 38,2 % | 1,7 | 1,55 | 0,06 | [0,27 – 1,98] |

* Valor referência, N= número de amostras avaliadas, P(%)= prevalência de soropositivos para *Anaplasma marginale*, χ^2 = qui-quadrada, RP = razão de prevalência, IC 95%= intervalo de confiança

É importante ressaltar que na propriedade estudada animais muito jovens não são expostos à infestação por carrapatos *R. microplus*, pois são mantidos em estábulos até os 30 dias de idade. Porém, nos animais dos grupos A e B este fato não foi evidenciado, verificou-se a primo-infestação por *R. microplus* em média até os primeiros 30 dias de vida, período em que os animais ainda eram mantidos sob um manejo sem acesso direto a pastagem. Este fator contribui para manutenção do agente durante todo o ano e não demonstrou ser um risco para doença clínica na população, o que corrobora Silva (2008) que demonstrou não haver diferença significativa na população de carrapatos *R. microplus* ao longo de todo o ano para a mesma região da Baixada Fluminense.

Poucas áreas do Brasil, até o momento, foram caracterizadas como de instabilidade enzoótica para *A. marginale*. Entre elas temos o estado de Sergipe, como exemplo para regiões climáticas do tipo árida, semi-árida, transição semi-árida e transição subúmida, onde a prevalência média foi de 16,3% (OLIVEIRA et al., 1992), a microrregião de Bagé, estado do Rio Grande do Sul, com clima subtropical úmido, e a região nordeste do estado do Pará, clima equatorial quente e úmido, em que a prevalência observada de animais reagentes para *A. marginale* foi de 64% e menor de 70% respectivamente (GUEDES JR et al., 2008).

A idade dos animais é considerada um fator determinante para a imunidade anti-*A. marginale*, uma vez que os animais jovens são mais resistentes à infecção primária. Se pelo menos 75% dos bezerros forem expostos à infecção entre 6 a 9 meses, a incidência da doença seria muito baixa e um estado de estabilidade endêmica natural pode vir a existir, relatam Mahoney e Ross (1972), para o gênero *Babesia* e Smith et al. (1989) para anaplasmose.

No presente estudo a soroprevalência anti-*A. marginale* foi de 39,8% nos bezerros da faixa etária até 30 dias, apresentando uma queda para 23,3% e voltando a aumentar com a idade dos animais, atingindo prevalência de 38,2% na faixa etária entre 120 e 180 dias

(Tabela 3), corroborando com estudos anteriores realizados no Brasil e Costa Rica (PÉREZ et al., 1980). Segundo Melo et al. (2001), mais de 90% dos bezerros apresentam anticorpos anti-*A. marginale* antes dos 30 dias de idade, sendo que, entre 90 e 150 dias, estes valores caem até atingirem um mínimo de 13,6%. E, a partir dos 180 dias de idade, por conta da primo-infecção, mais de 96% tornam-se positivos novamente, o que corrobora os resultados descritos na tabela 3 porém com percentuais menos elevados.

O percentual de amostras positivas ($NE \geq 3$) que abrange todas as faixas etárias (1 a 180 dias) foi de 31,4 (504/1607). Este fato indica que, para o grupo de bezerros estudado na propriedade, a situação é de instabilidade enzoótica, o que contrasta com a condição descrita por Souza et al. (2000), que descreveram a mesorregião Norte Fluminense como de estabilidade enzoótica para anaplasrose. Trata-se, portanto, de uma situação, ao menos para a faixa etária pesquisada (180 dias), da condição de instabilidade dentro de uma área estável, e corrobora Silva (2012). Este mesmo autor sugere que, em estudos epidemiológicos, cada propriedade seja considerada uma "unidade epidemiológica", com suas restrições e particularidades, na qual inúmeros fatores de risco, como práticas de manejo em pastagens, aspectos sanitários, manipulação genética das raças, estado fisiológico, população de artrópodes vetores e a idade dos animais, influenciem diretamente na frequência do agente *A. marginale* e seu vetor no rebanho.

Madruga et al. (1985) observaram que, três dias após o nascimento 36% dos bezerros foram soronegativos para anticorpos anti-*A. marginale*, com redução para 13,3% aos 15 dias de vida, ou seja, mais de 85% dos animais possuíam resposta sorológica anti-*A. marginale* até 15 dias. Estes autores relataram que as primeiras riquetsemias foram diagnosticadas a partir dos 30 dias de idade, sugerindo uma primo-infecção nos primeiros dias de vida, sendo que as maiores riquetsemias ocorreram somente entre 60 e 120 dias.

A coleta das amostras de soro e sangue realizadas com intervalos iniciais médios de 3 dias no presente estudo, ocorreu na intenção de detectar de forma mais precoce a primo-infecção por *A. marginale* no rebanho. De acordo com a literatura os períodos médios relatados para tal foram a cada 15 dias após o nascimento dos bezerros (ANDRADE et al., 2001, PACHECO et al., 2004; SILVA, 2008).

Para amplificação do gene MSP5 de *A. marginale* pela PCR, apenas os animais do grupo A foram avaliados, pois, como critérios de exclusão, somente seriam diagnosticados o grupo B caso os resultados soroepidemiológicos dos grupos fossem muito distinto em relação a estação de nascimento, o que não foi observado.

A relação entre o número de animais infectados, detectados pela PCR e o número de expostos ao longo do período foi muito curta, pois em apenas 13 dias todos os indivíduos avaliados ($n=21$) apresentaram resultados positivo para *A. marginale* (Figura 2 e Tabela 5). Estes resultados positivos em todos os bezerros pela detecção molecular do agente ainda aos primeiros dias de vida (13 dias) podem justificar a taxa de anticorpos ao nascimento, em razão da infecção por *A. marginale* ocorrer no desenvolvimento intra-uterino e estimular o sistema imunológico durante a gestação.

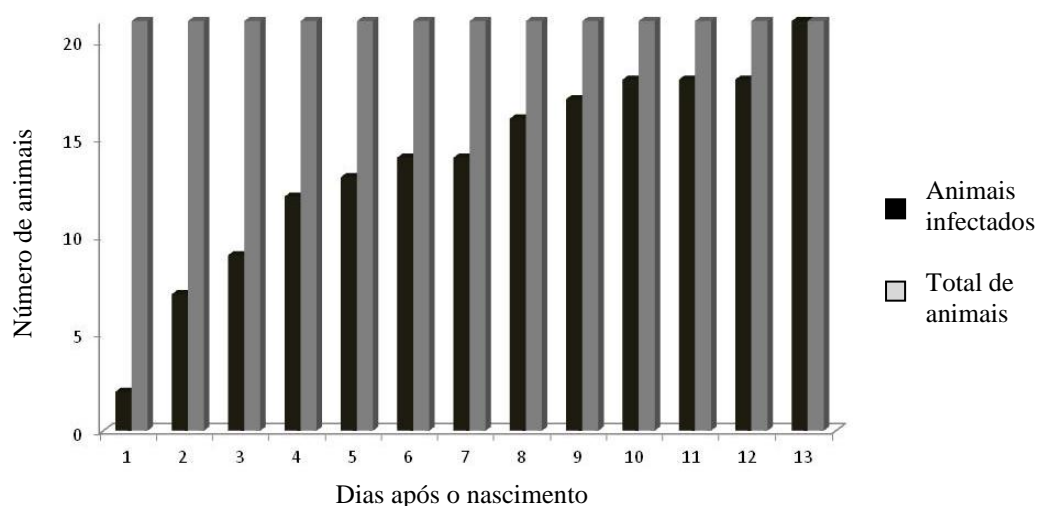


Figura 2. Evolução do risco de infecção por *Anaplasma marginale* em bezerros recém-nascidos detectados positivos pela PCR, amostras coletadas em 2009 em uma propriedade da Baixada Fluminense-RJ.

Tabela 5. Detecção da primo-infecção por *Anaplasma marginale* pela técnica da PCR em bezerros em relação ao dia após o nascimento, amostras coletadas em 2009 em uma propriedade da Baixada Fluminense-RJ.

| Animal | Dia após o nascimento | | | | | | | | | | | | |
|--------|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| 1 | | | | | | | | | | | | | + |
| 2 | | | | | | + | | | | | | | |
| 3 | | | + | | | | | | | | | | |
| 4 | + | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | + | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | + | | | |
| 7 | | | | + | | | | | | | | | |
| 8 | + | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | + | | | | | | | | | | | |
| 10 | | + | | | | | | | | | | | |
| 11 | | | | + | | | | | | | | | |
| 12 | | | | | | | | | | | | | + |
| 13 | | | | + | | | | | | | | | |
| 14 | | | | | | | | + | | | | | |
| 15 | | + | | | | | | | | | | | |
| 16 | | + | | | | | | | | | | | |
| 17 | | | | | | | | | + | | | | |
| 18 | | | | | | | | | | | | | + |
| 19 | | | | | + | | | | | | | | |
| 20 | | | | | | | | + | | | | | |
| 21 | | + | | | | | | | | | | | |

+ significa resposta positiva da PCR para amplificação do gene MSP5 de *A. marginale* (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998).

Pacheco et al. (2004) detectaram infecção em bezerros pela primeira vez apenas aos 45 dias de vida, com a totalidade de animais positivos apenas aos 105 dias de idade. Os animais daquele estudo foram diagnosticados negativos ao nascimento, o que difere da presente pesquisa, e reforça a possibilidade de transmissão intra-uterina. Os resultados encontrados (Figura 2) indicam a possibilidade da transmissão ocorrer de forma transplacentária no rebanho, corroborando Zaugg e Luttlar (1984).

Mesmo quando se considera a patogenia mínima da infecção descrito por Gale et al. (1996) e Kocan et al. (2003), até os sete dias de vida os dados indicavam aproximadamente 66,6% do rebanho positivo para este período. Este valor dá indícios e reforça a presente pesquisa de que houve infecção antes do nascimento dos animais, ou seja, ainda durante a gestação.

Nenhum episódio de aborto ou seqüelas reprodutivas em decorrência a infecção por *A. marginale* foi observado na propriedade, o que se opõe ao descrito por Fowler e Swift (1975) em vacas inoculadas no último trimestre de gestação que observaram sinais clínicos de anaplasmose, incluindo anemia, anorexia e elevada perda de peso. Na maioria dos casos os fetos foram infectados quando a vaca havia sido infectada durante o período de gestação (KESSLER, 2001), embora outros autores sugiram que a transmissão intrauterina ou transplacentária possa ocorrer em vacas cronicamente infectadas (RIBEIRO et al., 1984).

Animais com resultados de infecção detectados tão precocemente por PCR, associado aos resultados sorológicos encontrados por Silva (2012) para a mesma região, dão indícios da transmissão transplacentária ser efetiva sem a necessidade de manifestação aguda da infecção por parte das progenitoras, o que discorda de Norton et al. (1983) e Fowler; Swift (1975).

Não foi evidenciado nenhum caso de doença clínica compatível com anaplasmose, bem como, não houve mortes por infecção de *A. marginale*. Norton et al. (1983) na Austrália descrevem, mesmo que experimentalmente, casos de morte em decorrência a infecção por *A. marginale*. Estes fatos podem estar relacionados a patogenicidade da cepa em questão, pois de acordo com Kano et al. (2002) os episódios de óbito possuem intrínseca relação com a virulência do patógeno. Não se pode esquecer de considerar que as mortes podem estar relacionadas também com a quantidade de patógeno inoculado durante o trabalho realizado por Norton et al. (1983).

Quando confrontados os valores obtidos no processamento sorológico (Tabela 3) para a menor faixa etária de bezerros (39,8%), 100% dos animais apresentam resultado positivo aos 13 dias de vida para amplificação por PCR do gene MSP5 de *A. marginale* (Figura 2), que é uma das proteínas de superfície que se mantém conservada na espécie (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998).

Este fator nos leva a questionar a caracterização antigênica de *A. marginale* na região, pois existe a possibilidade da virulência da cepa em questão ser baixa, o que gera situações contrastantes, como animais positivos ainda nos primeiros dias de vida sem manifestação de qualquer sinal clínico mesmo após alguns meses de vida (KANO et al., 2002) e baixa titulação de anticorpos Anti-*A. marginale* neste período (SILVA, 2008). De acordo com Guedes Jr et al. (2010) esta caracterização é importante inclusive no que diz respeito a possíveis vacinas que estimulem o sistema imune a controlar e combater o *A. marginale*.

Alguns trabalhos descrevem ser improvável que a infecção dos fetos seja provocada por eritrócitos infectados por *A. marginale* através da barreira transplacentária. Segundo os autores, talvez a maior probabilidade seja a ocorrência de alguma fase extra-celular durante o ciclo de *A. marginale* que permita uma outra via de acesso ao feto que não a transplacentária (RISTIC, 1960, FOWLER; SWIFT, 1975).

A luz dos conhecimentos atuais sobre a anaplasmose, doença amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais criadoras de bovinos, pode-se inferir que o equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro depende também de um balanceamento do ambiente e seus mais

importantes vetores, representado por diferentes espécies de carrapatos. Embora a epidemiologia e as condições ambientais que favorecem ou desfavorecem o ressurgimento da doença sejam conhecidos, estudos realizados por Pacheco et al. (2004) mostram que pequenas alterações de manejo envolvendo os bezerros e os animais adultos podem provocar diferenças significativas na dinâmica da infecção.

Considerando que, animais de raças especializadas na produção de leite constituem-se no futuro da cadeia produtiva, os aspectos da sanidade e da relação entre parasitos e hospedeiros assumem importância relevante. Um animal mal manejado, nutrido ou tratado sem os devidos cuidados, não irá atingir seu potencial máximo ao longo da vida produtiva. Provavelmente irá ocorrer um retardo considerável no seu desenvolvimento, gerando grandes prejuízos econômicos. (PACHECO et al., 2004).

No presente estudo, não houve sinal clínico algum compatível com a anaplasose bovina, o que pode ser claramente justificado pelo bom manejo aplicado na propriedade, tanto o zootécnico quanto o sanitário. Nenhum episódio de febre, apatia ou mesmo morte foi observado.

De acordo com Silva (2008), sob condições naturais de parasitismo, as cargas de *R. microplus* e hemoparasitos, como *A. marginale*, não eram suficiente para acarretar prejuízo no perfil hematológico dos animais. Os valores da concentração de hemácias, bem como os demais parâmetros sanguíneos estiveram dentro do padrão de normalidade para a espécie. Em bovinos considera-se normal o hematócrito que apresente valores entre 26 e 42% (MEYER et al, 1995), o que pôde ser evidenciado no presente estudo.

Conforme os resultados, a técnica da PCR demonstrou ser mais eficaz, em relação a diagnóstico, para o estudo de uma classificação/situação epidemiológica. Esta técnica não deve ser analisada epidemiologicamente de forma isolada, pois somente resultados positivos podem significar o contato com o agente sem necessariamente doença clínica, dependendo do manejo da propriedade e da patogenicidade da cepa.

5 CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que os animais estudados apresentaram baixos títulos de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale*.

Bezerros com idade entre 30 e 60 dias apresentaram maior risco para desenvolverem Anaplasmoze clínica.

Anaplasma marginale foi detectado em todos os animais antes de completarem 15 dias de vida.

Os resultados moleculares permitem sugerir a possibilidade de ocorrência da transmissão transplacentária de *A. marginale*, sem registro de abortos ou mortes de animais, no rebanho pesquisado.

A técnica PCR demonstrou ser mais efetiva e mais sensível para se estabelecer o diagnóstico de *A. marginale* e o levantamento epidemiológico de uma propriedade do que somente o iELISA.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, D. H.; GAIDO, A. B.; VINABAL, A. E.; DE ECHAIDE, S. T.; GUGLIELMONE, A. A. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. **Parasite**, v. 1, n. 4, p. 405-407, 1994.
- ALLEMAN, A. R., BARBET, A. F. Evaluation of *Anaplasma marginale* major surface protein 3 (MSP3) as a diagnostic test antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 270-276, 1996.
- ALLEMAN, A.R.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; MCELWAIN, T.F.; PERRYMAN, L.E.; BARBET, A.F. *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 1, p. 156 – 163, 1997.
- ALONSO, M., ARELLANO-SOTA, C., CERESER, V.H., CORDOVES, C.O., GUGLIELMONE, A.A., KESSLER, R.H., MANGOLD, A.J., NARI, A., PATARROYO, J.H., SOLARI, M.A. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. **Revue Science Technology**, v.11, n.1, p.713–733, 1992.
- AMERAULT, T. E., ROBY, T. O. A rapid card agglutination test for bovine anaplasmosis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 153, p. 1828-1834, 1968.
- ANDRADE, G. M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C. YOSHIHARA, E.; KANO, F. S.; AMARAL, C. H. S. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in dairy cattle and, studies on the dynamics of natural infection of Holstein calves in Southern Brazil. **Ciências Agrárias**, v. 22, n.2, p. 155-159, 2001.
- ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; ALMEIDA, M. A. O.; LEAL, C. R. B.; MIGUITA, M. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no estado da Bahia pela imunofluorescência indireta e teste de congutinação rápida. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 111–115, 1997.
- ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; BASTOS, P. A. S.; MARQUES, A. P. C. Frequência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.50, n.3, p.243-246, 1998.
- AUBRY, P.; GEALE, D. W. A review of bovine anaplasmosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.58, n.1, p.1-30, 2011.
- AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. *BioEstat 4.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Editora Sociedade Civil Mamirauá, Belém. 272p. 2000.
- BACANELLI, G.; ARAÚJO, F. R.; RAMOS, C. A. N.; OLIVEIRA, R. H. M. **Detecção de *Anaplasma marginale* por meio de PCR em tempo real**. 2008. 49p. In: Dissertação de Mestrado, UFMS Campo Grande, MS.

- BARBET, A. F. Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p. 43-49, 1995.
- BARBET, A. F., LUNDGREN, A., YI, J., RURANGIRWA, F.R., PALMER, G.H. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* by expression of MSP2 mosaics. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 6133-6138, 2000.
- BARRINGTON, G.M.; PARISH, S.M. Bovine neonatal immunology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 17, p. 463-476, 2001.
- BAUMGARTNER, W., SCHLERKA, G., FUMICZ, M., STOGER, T., AWAD-MASAMEH, M., SCHULLER, W., WEBER, P. Seroprevalence survey for *Anaplasma marginale* infection of Austrian cattle. **Zent. Veterinary**. v. 39, p. 97-104, 1992.
- BLOUIN, E. F., KOCAN, K. M., Morphology and development of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in cultured *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) cells. **Journal of Medical Entomology**. v. 35, p. 788-797, 1998.
- BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T; DE VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 61-74, 1995.
- BRAYTON, K.A., KAPPEMEYER, L.S., HERDON, D.R., DARK, M. J., TIBBALS, D.L., PALMER, G. H., MCGUIRE, T. C., KNOWLES, D. P. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 102, p. 844-849. 2005.
- BROWN, W.C.; PALMER, G.H.; LEWIN, H.A.; MCGUIRE, T.C. CD4(+) T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. **Infection and Immunity**, v.69, n.11, p.6853–6862, 2001.
- BROWN, W.C.; SHKAP, V.; ZHU, D.; MCGUIRE, T.C.; TUO, W.; MCELWAIN, T.F.; PALMER, G.H. CD4+ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. **Infection Immunology**, v. 66, n. 11, p. 5406–5413, 1998.
- CAEIRO, V. General review of tick species present in Portugal. **Parasitology**, v. 41, p. 11-15, 1999.
- CALLOW, L. L. Vaccination against bovine babesiosis. In: MILLER, L. H.; PINO, J. A.; MCKELVEY, J. J. **Immunity to Blood Parasites of Animals and Man**. New York: Plenum Press, 1977. p. 121.
- CANTOR, G. H., PONTZER, C. H., PALMER, G. H. Opsonization of *Anaplasma marginale* mediated by bovine antibody against surface protein msp-1. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 37, p. 343-350. 1993.
- CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; CECI, L.; BUONAVOGLIA, C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in

blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary Microbiology**, v.124, n.1-2, p.107–114, 2007.

CONSTANTINOIU, C. C.; JACKSON, L. A.; JORGENSEN, W. K.; LEW-TABOR, A. E.; PIPER, E. K.; MAYER, D. G.; VENUS, B.; JONSSON, N. N. Local immune response against larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v.40, n.1, 865-875, 2010.

CORONA, B., MAZORRA, L.M., BLANDINO, T., MARTÍNEZ, S. Detección de *Anaplasma marginale* mediante amplificación del gen *msp5*. **Revista de Salud Animal**. v. 22, p. 168-173. 2000.

CORREA, W. M.; CORREA, C. N.; GOTTSCHALK, A. F. Bovine abortion associated with *Anaplasma marginale*. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 42, n. 2, p. 227-228, 1978.

CRINGOLI, G. OTRANTO D., TESTINI, G., BUONO, V., GIULIO, G. D., TRAVESA, D., LIA, R., RINALDI, L., VENECIANO, V., PUCCINI, V. Epidemiology of bovine tick-borne disease in southern Italy. **Veterinary Research**, v. 33, n. 4, p. 421-426, 2002.

D'ANDREA, L. A. Z.; SARTOR, I. F.; MADRUGA, C. R.; FREITAS, S. B. Z.; KROLL, L. B.; KRONKA, S. N. Immunological condition of cattle in Holstein and Nelore breed in regard to *Babesia bovis* and *B. bigemina* in two regions of the State of São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.26, n.2, p.74-78, 2006.

DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M.; Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants in persistently infected ticks. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 5151–5156, 2001.

DE LA FUENTE, J., GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 145-153, 2001a.

DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F., KOCAN, K. M. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. **Veterinary Microbiology**, v.91, p. 265–283, 2003.

DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; MCEWEN, B.R.; CLAWSON, D.; KOCAN, K.M. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. **International Journal for Parasitology**, v.31, n.14, p.1705–1714, 2001b.

DE LA FUENTE, J.; LEW, A.; LUTZ, H.; MELI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; MANGOLD, A.J.; ALMAZAN, C.; NARANJO, V.; GORTAZAR, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; GARCIA-PEREZ, A. L.; BARRAL, M.; OPORTO, B.; CECI, L.; CARELLI, G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Genetic diversity of anaplasma species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 75-89, 2005.

DE LA FUENTE, J.; NARANJO, V.; RUIZ-FONS, F.; VICENTE, J.; ESTRADA-PENÃ, A.N.; ALMAZÁN, C.; KOCAN, K.M.; MARTÍN, M.P.; GORTÁZAR, C. Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. **European Journal of Wildlife Research**, v.50, n.4, p.187–196, 2004.

DECARO, N., CARELLI, G., LORUSSO, E., LUCENTE, M.S., GRECO, G., LORUSSO, A., RADOGNA, A., CECI, L., BUONAVOGLIA, C. Duplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection and quantification of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma central*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 606–611. 2008.

DIKMANS, G. The transmission of anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.11, p.5-6, 1950.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; AND RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonymous of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

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

ERIKS, I. S.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; ALLRED, D. R.; BARBET, A. F. Detection and qualitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.2, p.279-284, 1989.

ESTES, D. M.; CLOSSER, N. M.; ALLEN, G. K. IFN- γ stimulates IgG₂ production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. **Cell Immunology**, v.154, n.2, p.287-295, 1994.

EWING, S.A. **Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods**. In: Hidalgo, R.J., Jones, E.W. (Eds.), Proc. 7° Nat. Anaplasmosis Conf., Mississippi State University, MS, p.395–423, 1981.

FARIAS, N. A. R., **Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina**. Editora Agropecuária: Guaíba, Porto Alegre. p. 80. 1995.

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

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2006. Disponível em:<<http://www.fao.org>>. Acesso em 05/01/2008.

FOWLER, D.; SWIFT, B. L. Abortion in cows inoculated with *Anaplasma marginale*. **Division of Microbiology and Veterinary Medicine**, v. 4, n. 2-3, p. 59-67, 1975.

FUTSE, J. E.; UETI, M. W.; KNOWLES, D. P. JR.; PALMER, G. H. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3829-3834, 2003.

GALE, K. R.; DIMMOCK, C. M.; GARTSIDE, M.; LEATCH, G. *Anaplasma marginale*: detection of carrier cattle by PCR-ELISA. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 1103-1109, 1996.

GOFF, W., BARBET, A. F., STILLER, D. Detection of *Anaplasma marginale* infected tick vectors by using a cloned DNA probe. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 919-923. 1988.

GUEDES JR., D. S. **Prevalência de anticorpos para agentes da Tristeza parasitária Bovina, Trypanosoma vivax e Borrelia sp. em bovinos do nordeste do estado do Pará, Brasil.** 2006. 87p. Dissertação de Mestrado, UFRRJ, Seropédica, RJ.

GUEDES JR, D.S.; ARAÚJO, F.R.; SILVA, F.J.M.; RANGEL, C.P.; BARBOSA NETO, J.D.; FONSECA, A.H. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the Northeastern region of the State of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 105-109, 2008.

GUEDES JR., D. S. **Caracterização genotípica de Borrelia sp e de genes de Anaplasma marginale que codificam proteínas de membrana com potencial imunogênico.** 2010. 100p. Tese Doutorado, UFRRJ, Seropédica, RJ.

GUEDES JR, D. S., ARAÚJO, F. R., JUNIOR, N. F. A., ADI, S. S., CHEUNG, L. M., FRAGOSO, S. P., RAMOS, C. A. N., OLIVEIRA, R. M., SANTOS, C. S., BACANELLI, G., SOARES, C. O., ROSINHA, G. M. S., FONSECA, A. H. Analysis of membrane protein genes in Brazilian isolate of *Anaplasma marginale*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 843-849, 2010.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2003. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 05/01/2008.

KANO, F. S.; VIDOTTO, O. ; PACHECO, R. C.; VIDOTTO, M. C. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 131–138, 2002.

KESSLER, R. H., Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.

KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R.; JESUS, E. F. ; SEMPREBOM, D. V. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p. 747-752, 1987.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M.; Carrapato, **Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos bovinos.** Campo Grande, MS: EMBRAPA-CNPGC, 1998.

- KIESER, S. T.; ERIKS, I. S.; PALMER, G. H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 4, p.1 117-1119, 1990.
- KIM, C.; ISEKI, H.; HERBAS, M. S.; YOKOYAMA, N.; SUZUKI, H.; XUAN, X.; FUJISAKI, K.; IGARASHI, I. Development of Taqman-Based Real-Time PCR Assays for Diagnostic Detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 837–841, 2007.
- KNOWLES, D.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; PALMER, G.; McGUIRE, T.; STILLER, D.; McELWAIN, T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MPS5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, 1996.
- KOCAN, K. M., BLOUIN, E. F., BARBET, A. F. Anaplasmosis control: past, present and future. **Annals of New York Academy Science**. v. 916, p. 501–509, 2000.
- KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; GARCIA-GARCIA, J. C. Adaptations of the tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, for survival in cattle and ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, n. 1-4, p. 9-25, 2002.
- KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; GARCIA-GARCIA, J. C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v. 129, p. S285-S300, 2004.
- KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELÉNDEZ, R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical of Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.
- KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E.F.; COETZEE, J.F; EWING, S.A.; The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v.167, n.2-4, p.95–107, 2010.
- KOCAN, K.M.; HALBUR, T.; BLOUIN, E.F.; ONET, V.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; SALIKI, J.T. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 151-161. 2001.
- KOCAN, K.M.; STILLER, D.; GOFF, W.L.; CLAYPOOL, P.L.; EDWARDS, W.; EWING, S.A.; MCGUIRE, T.C.; HAIR, J.A.; BARRON, S.J. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from infected to susceptible cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.5, n.4, p.499–507, 1992.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONAK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJOBACK, R., SJOGREEN, B., STROMBOM, L., STAHLBERG, A., ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 27, p. 95–125. 2006.
- LIU, Z.; LUO, J., BAI, Q., MA, M., GUAN, G., YIN, H. Amplification of 16S rRNA genes of *Anaplasma* species in china for phylogenetics analysis. **Veterinary Microbiology**, v. 107, p. 145-148, 2005.

LOHR, C. V., RURANGIRWA, F. R., MCELWAIN, T. F., STILLER, D., PALMER, G. H. Specific Expression of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 Salivary Gland Variants Occurs in the Midgut and Is an Early Event during Tick Transmission. **Infect and Immunology**, v. 70, p. 114-120, 2002.

MACHADO, R. Z.; MONTASSIER, H. J.; PINTO, A. A.; LEMOS, E. G.; MACHADO, M. R.; VALADÃO, I. F.; BARCI, L. G.; MALHEIROS, E. B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 1, p. 17-26. 1997.

MADRUGA, C. R.; HONER, M. R.; SCHENK, M. A. M.; CURVO, J. B. E. **Avaliação preliminar dos parâmetros da Tristeza Parasitária Bovina em Mato Grosso do Sul**. EMBRAPA-CNPQC, Campo Grande-MS, 1987. 7p.

MADRUGA, C. R.; KESSLER, R. H.; GOMES, A.; SCHENK, M. A. M.; ANDRADE, D. F. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça nelore, ibagé e cruzamentos de nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, n.1, p.135-142, 1985.

MADRUGA, C. R.; MARQUES, A. P. C.; LEAL, C. R. B.; CARVALHO, C. M. E.; ARAÚJO, F. R.; KESSLER, R. H. Evaluation of a enzyme linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 109-112, 2000.

MAHONEY, D. F. Bovine babesiosis: An assessment of the significance of complement fixing antibody based upon experimental infection. **Australian Veterinary Journal**, v. 40, p. 369-375, 1964.

MAHONEY, D. F.; MIRRE, G. B. Bovine babesiosis: Estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (CANESTRINI). **Annals of Tropical Medicine Parasitology**, v. 65, p. 309-317, 1971.

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

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. **Medicina de laboratório veterinária – Interpretação e diagnóstico**. 1ª Ed. São Paulo: Roca LTDA, 308p. 1995.

MARANA, E. R. M., ALFIERI, A. A., ANDRADE, G. M., FREIRE, R. L., GARCIA, J. L., VIDOTTO, O. Comparação dos testes sorológicos de Imunofluorescência Indireta, Conglutinação Rápida, ELISA indireto e ELISA por competição para a detecção de anticorpos contra o *Anaplasma marginale* em soros de bovinos de diferentes áreas enzoóticas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, p. 629-638, 2006.

MARANA, E. R. M.; DIAS, J. A.; FREIRE, R. L.; VICENTINI, J. C.; VIDOTTO, M. C.; VIDOTTO, O. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná, Brasil, por um teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 20-26, 2009.

MASSARD, C. L.; SOARES, C. O.; FONSECA, A. H. ; MADRUGA, C. L.. Tristeza parasitária bovina: Histórico, biologia e modalidades de transmissão de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* aos bovinos. In: **Curso sobre controle de carrapato em bovinos**. EMBRAPA-CNPGC, Campo Grande-MS, 1998, p. 77-90.

MCGUIRE, T. C.; DAVIS, W. C.; BRASSFIELD, A. L.; McELWAIN, T. F.; PALMER G. H. Identification of *Anaplasma marginale* long-term carrier cattle by detection of serumantibody to isolated MSP-3. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 788-93, 1991.

MELO, V. S. P.; PASSOS, L. M. F.; FACURY-FILHO, E. J.; SATURNINO, H. M.; RIBEIRO, M. F. Natural infection of calves by *Anaplasma marginale* in dairy herds of the Metalúrgica Region, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 146-150, 2001.

MIYAZAKI, Y., YOGA, H., KOHNO, S., KAKU, M. Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2228-2232, 1993.

MOLAD, T., MAZUZ, M. L., FLEIDEROVITZ, L., FISH, L., SAVITSKY, I., KRIEL, Y., LEIBOVITZ, B., MOLLOY, J., JONGEJAN, F., SHKAP, V. Molecular and serological detection of *A. centrale* and *A. marginale* infected cattle grazing within an endemic area. **Veterinary Microbiology**. v. 113, p. 55-62, 2006.

MONTENEGRO-JAMES, S.; GUILLEN, A.T.; MA, S.J.; TAPANG, P.; ABDEL-GAWAD, A.; TORO, M.; RISTIC, M. Use of the dot enzyme-linked immunosorbent assay with isolated *Anaplasma marginale* initial bodies for serodiagnosis of anaplasmosis in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.51, n.10, p.1518-1521, 1990.

MURREL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 169–172, 2003.

NOH, S. M., BRAYTON, K. A., BROWN, W. C., NORIMINE, J., MUNSKE, G. R., DAVITT, C. M., PALMER, G. H. Composition of the surface proteome of *Anaplasma marginale* and its role in protective immunity induced by outer membrane immunization. **Infect and Immunology**, v. 76, p. 2219-2226, 2008.

NORTON, J. H.; PARKER, R. J.; FORBES-FAULKNER, J. C. Neonatal anaplasmosis in a calf. **Veterinary Record**, v. 100, n. 3, p. 58, 1983.

OLIVEIRA, A. A., PEDREIRA, P. A. S., ALMEIDA, M. F. R. S. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasnose no estado de Sergipe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 377-386, 1992.

PACHECO, R. C.; VIDOTTO, O.; TAMEKUNI, K.; IGARASHI, M.; KAWASAKI, P. PRUDÊNCIO, L. B. MARANA, E. R. M.; PEREIRA, A. L. Dinâmica da infecção natural pelo *Anaplasma marginale* em vacas e bezerros da raça Holandesa, na região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Ciências Agrárias**, v. 25, n. 3, p. 235-244, 2004.

- PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; KUTTLER, K. L.; MCGUIRE, T. C. Detection of an *Anaplasma marginale* common surface protein present in all stages of infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 1078-1083, 1986.
- PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. **Journal of Immunology**, v.133, n.2, p.1010-1015, 1984.
- PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F. R.; KOCAN, K. M.; BROWN, W. C. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 7, p. 281-286, 1999.
- PALMER, G. H.; W. C. BROWN, W. C.; RURANGIRWA, F. R. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. **Microbes and Infection**, v.2, n.1, p.167–176, 2000.
- PÉREZ, E.; LEROY, E.; CARRILLO, J. M. Anaplasmosis y piroplasmosis: estudio epidemiológico en la estación experimental, Los Diamantes. **Ciencias Veterinarias**, v.2, n.1 , p.7-20, 1980.
- POPOV, V. L.; HAN, V. C.; CHEN, S. M.; DUMLER, J. S.; FENG, H. M.; ANDREADIS, T.G.; TESH, R. B.; WALKER, D. H. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 235-251, 1998.
- POTGIETER, F. T.; SUTHERLAND, B.; BIGGS, H. C. Attempts to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca rufipes* and *Stomoxys calcitrans*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 2, p. 119-122, 1981.
- POTGIETER, F.T.; STOLTSZ, W.H. Anaplasmosis. In: Coetzer, J.A.W., Thompson, G.R., Tustin, R.C. (Eds.), **Infectious Diseases of Livestock- With Special Reference to Southern Africa**. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, 1994, p.408–430.
- PRUETT, J. H.; OLAFSON, P. U.; DAVEY, R. B. Serologically defined *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larval antigens in BmLF3, a partially pure Sephacryl S-300 fraction of crude larval proteins. **Veterinary Parasitology**, v.155, n.2-3, p.264–272, 2008.
- RIBEIRO, M. F. B. **Morfologia, evolução e reprodução do *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) em células epiteliais intestinais de teleóginas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Estudo ao microscópio óptico e eletrônico**. 1991. 134p. Tese, UFMG, Belo Horizonte, MG.
- RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.61, n.1-2, p.31-39, 1996.
- RIBEIRO, M. F. B.; PATARROYO, J. H. S.; SANTOS, J. L.; FARIA, J. E. Epidemiologia da anaplasnose bovina no estado de Minas Gerais. I – Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v.36, n.4, p.425-432, 1984.

RIBEIRO, M. F. B.; REIS, R. Prevalência da Anaplasmosse em quatro regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v.33, n.1, p.57-62, 1981.

RIEK, R. F. Immunity to babesiosis. In: GARNHAN, P.C.C.; PIERCE, A.E.; ROITT, I., **Immunity to Protozoa**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1963, p. 160-179.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. São Paulo: Editora Varela, 574 p., 2001.

RISTIC, M. A capillary tube agglutination test for anaplasmosis: a preliminary report. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 141, p. 588-594, 1962.

RISTIC, M. Anaplasmosis. **Advances in Veterinary Science**, v.7, n.1, p.111-192, 1960.

RODRIGUEZ, S. D., GARCIA ORTIZ, M. A., HERNANDEZ SALGADO, G., SANTOS CERDA, N. A., ABOYTES TORRES, R.; CANTO ALARCON, G. J. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. **Comparative Immunology and Microbiology of Infectious Diseases**. v. 23, p. 239–252, 2000.

ROSE, J. E., AMERAULT, T. E., ROBY, T. O., MARTIN, W. H. Serum levels of conglutinin, complement, and immunoconglutinin in cattle infected with *Anaplasma marginale*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, p. 791-793, 1978.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, vol. I. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTANA, A. P. **Dinâmica da infecção natural por Babesia bigemina (Smith & Kilborne, 1983) em bezerros a partir do nascimento, avaliada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), esfregaço sanguíneo e imunofluorescência indireta**. 2000. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). UFG, Goiânia.

SCOLES, G. A.; BROCE, A. B.; LYSK, T. J.; PALMER, G. H. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) Compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 4, p. 668-675, 2005.

SILVA, F. J. M. **Relação entre infestação natural por Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) e níveis de anticorpos da classe IgG para os agentes da Tristeza Parasitária Bovina e Borrelia sp. em bezerros**. 2008. 50p. Dissertação de Mestrado, UFRRJ, Seropédica, RJ.

SILVA, J. B. **Análise dos fatores de risco relacionados à resistência ao Rhipicephalus microplus e à resposta imune-humoral contra Anaplasma marginale em bovinos leiteiros**. 2012. 196p. Dissertação UFRRJ, Seropédica, RJ.

SMITH, R. D.; HUNGERFORD, L. L.; ARMSTRONG, C. T. Epidemiologic investigation and control of an epizootic of anaplasmosis in cattle in winter. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.195, n.3, p.476–480, 1989.

SMITH, T.; KILBORNE, K. L. Investigations into the nature causation and prevention of Texas or Southern Cattle Fever. **Bureau of Animal Industry Bulling**, U.S. Department of Agricultural, Washington, n. 1, p. 1-103, 1893.

SOARES, C. O.; SOUZA, J. C. P., MADRUGA, C. R.; MADUREIRA, R. C.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na Mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 75-79, 2000.

SOUZA, J. C. P. **Prevenção e Estabilidade Enzoótica da Tristeza Parasitária Bovina em duas Mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro**. 2000. 135p. Tese de Doutorado. UFRRJ. Seropédica, RJ.

SOUZA, J. C. P., SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; SCOFIELD, A.; FONSECA, A. H. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* na Mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 97-101, 2000.

STICH R.W., BANTLE J.A., KOCAN K.M. Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmacetaeae) in hemolymph of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with the Polymerase Chain Reaction. **Journal of Medical Entomology**, v. 30, p. 781-788. 1993.

SWIFT, B. L.; PAUMER, R. J. Vertical transmission of *Anaplasma marginale* in cattle. **Division of Microbiology and Veterinary Medicine in University of Wyoming**. v. 6, n. 5, p. 515-521, 1976.

TEBELE, N., MCGUIRE, T.C., PALMER, G.H. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. **Infection and Immunity**. v. 59, p. 3199-3204, 1991.

TEMBUE, A. A. M.; SILVA, J. B.; SILVA, F. J. M.; PIRES, M. S.; BALDANI, C. D.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; DA FONSECA, A. H. Seroprevalence of IgG antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle from South Mozambique. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 318-324, 2011.

TEMBUE, A. A. S. M. **Hemoparasitos transmitidos por carrapatos e a percepção dos criadores sobre sua importância para bovinos na Região Sul de Moçambique**. 2012. 176p. Tese UFRRJ, Seropédica, RJ.

THEILER, A. *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.): A protozoon of cattle, a cause of the called gall-sickness. **Transmission Medicine Journal**, v.5, p.110-111, 1910.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária – uma introdução**. 6ed. São Paulo: Roca. 2002, 532p.

TODOROVIC, R. A.; TELLEZ, C. H. The premunition of adult cattle against babesiosis and anaplasmosis in Colombia, South America. **Tropical Animal Health and Production**, v. 7, n. 3, p. 125-131, 1975.

TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D. P.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; SUAREZ, C. E.; MCELWAIN, T. F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region endemicity by Nested PCR and a competitive Enzyme-Linked

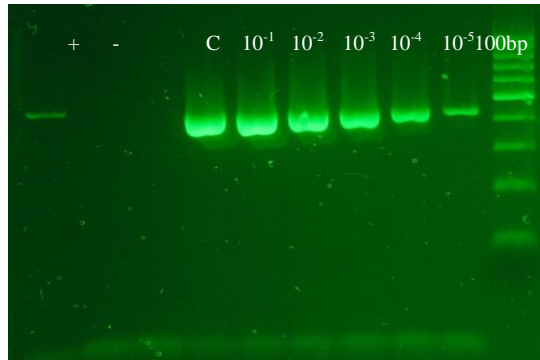
Immunosorbent Assay using recombinant major surface protein 5. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 777-782, 1998.

VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M.; Diagnóstico em Anaplasrose Bovina. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.361-368, 2001.

ZAUGG, J. L.; KUTTLER, K. L. Bovines anaplasmosis: in utero transmission and the immunologic significance of ingested colostrum antibodies. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, n.3, p.570-572, 1984.

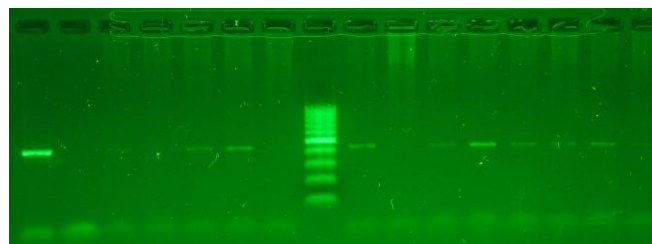
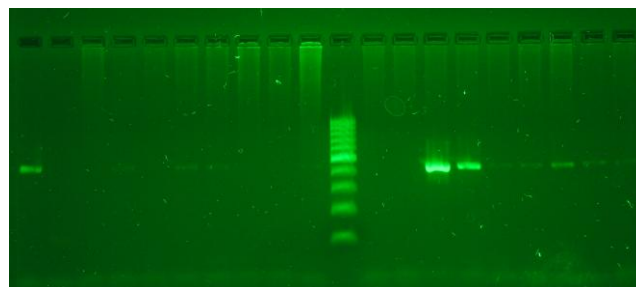
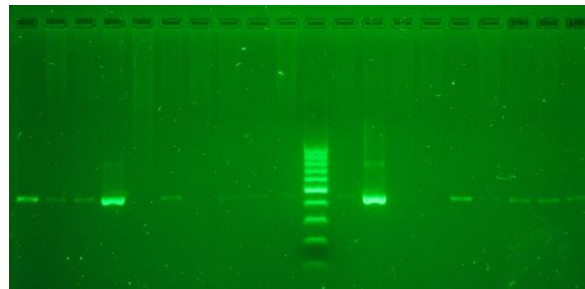
7 APÊNDICES

I – Detecção da menor concentração de DNA amplificado por meio de diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) de DNA positivo em água ultrapura.

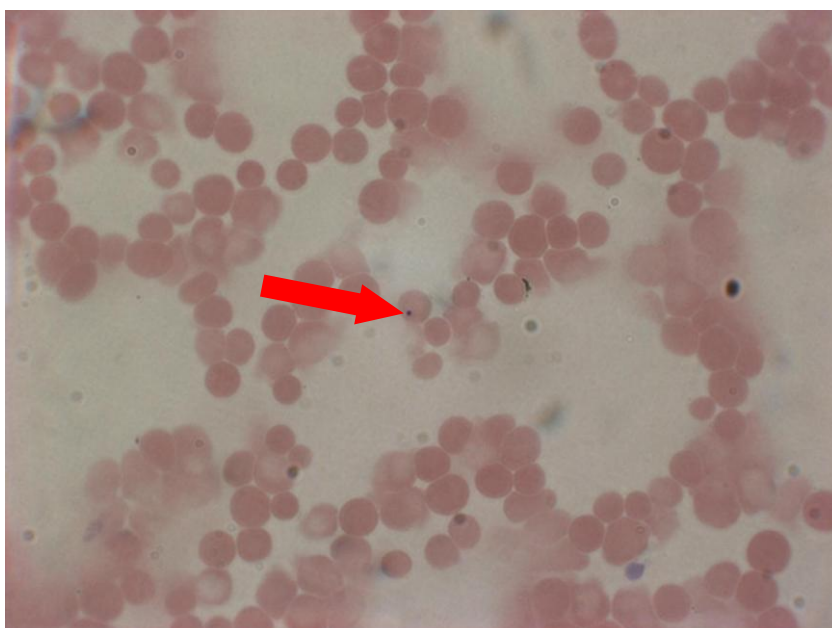
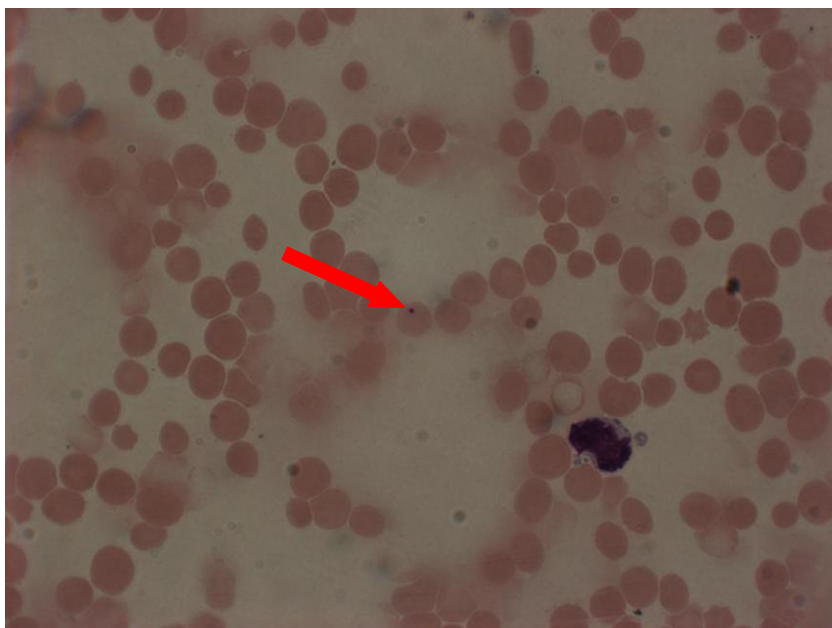


Gel de agarose 1,5%, (+) DNA positivo, (-) DNA negativo, (C) DNA do animal controle positivo com concentração final de 20 ng, diluições seriadas na ordem de 10^{-1} , concentração a 10^{-5} igual a 200 fg, 100 bp é o peso do marcador molecular.

II - Imagens do produto da amplificação do gene para MSP5 de *Anaplasma marginale* (458pb) pela técnica PCR de algumas amostras teste.



III – Imagens de esfregaços sanguíneos de bezerros pertencentes a Pesagro-RJ, positivos para *Anaplasma marginale* (seta vermelha), corados por Giemsa. Aumento de 100x.



Resposta imune humoral anti-*Anaplasma marginale* em bezerros recém nascidos na

Baixada Fluminense, RJ

Humoral immune response anti-*Anaplasma marginale* in newborn calves in Baixada

Fluminense region, RJ

Fabio Jorge Moreira da Silva^I Jenevaldo Barbosa da Silva^I Daniel Guedes Junior^{II} Charles Passos Rangel^I

Rafaella Câmara Teixeira^I Adivaldo Henrique da Fonseca^{I*} João Luiz Horácio Faccini^I

RESUMO

Os objetivos do trabalho foram avaliar a prevalência e a evolução soropidemiológica para *Anaplasma marginale* em 41 bezerras do nascimento até completarem 180 dias. Os animais pertenciam ao Centro Estadual de Pesquisa em Agricultura Orgânica – Pesagro-Rio, Seropédica-RJ. O estudo foi conduzido nas estações chuvosa e seca, e foram coletadas um total de 1.607 amostras de sangue, com intervalo inicial de três dias e processados utilizando o teste ELISA indireto. Os valores percentuais de soroprevalência para *A. marginale* em função da idade foram submetidos ao teste χ^2 a 5% de significância. A prevalência de anticorpos anti-*A. marginale*, em bezerros, em função da idade foi de 39.8% nos animais com idade inferior a 30 dias, 23.3% entre 30 e 60 dias, 27.3% entre 60 e 120 dias e 38.2% entre 120 e 180 dias. Bezerros com idade 30 - 60, 60 - 120 e 120 - 180 dias apresentaram respectivamente 1.90, 1.75 e 1.55 mais risco de serem soronegativos para *A. marginale* do que os animais recém nascidos. Os resultados demonstram que durante todo o estudo os animais apresentaram

^I Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR465, Km 07, 23890-000, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. *Autor para correspondência, e-mail: adivaldo@ufrj.br

^{II} Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA). Bio-Manguinhos/Fiocruz. Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro CEP: 21040-360.

baixos títulos de anticorpos anti-*A. marginale* estando propensos a apresentarem anaplasrose clínica. Além disso, o rebanho foi considerado epidemiologicamente instável para *A. marginale*.

Palavras-chave: Anaplasrose, bezerros, imunodiagnóstico, prevalência.

ABSTRACT

The objectives were to evaluate the prevalence and the seroepidemiological condition for *Anaplasma marginale* in 41 calves from birth to completed 180 days. The animals belonged to “Centro Estadual de Pesquisa em Agricultura Orgânica” – Pesagro-Rio, Seropédica-RJ. The study was conducted during the rainy and dry seasons and collected a total of 1607 blood samples, initially every three days and processed using indirect ELISA test. Percent values for *A. marginale* seroprevalence as function of age were tested using the χ^2 test at 5% significance level. The prevalence of anti-*A. marginale* antibodies were 39.8% in calves aged less than 30 days, 23.3% between 30 and 60 days, 27.3% between 60 and 120 days and 38.2% between 120 and 180 days. Calves aged between 30 and 60, 60 and 120 and 120 and 180 days were respectively 1.90, 1.75 and 1.55 more likely to be seronegative for *A. marginale* than newborn ones. The results show that during the study calves had low levels of anti-*A. marginale* antibodies, a condition that predisposes them to the development of clinical anaplasmosis. In addition, the herd was considered unstable epidemiologically to *A. marginale* infection.

Key words: Anaplasmosis, calves, immunodiagnosis, prevalence

INTRODUÇÃO

Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae) é o mais prevalente patógeno de bovinos transmitido por carrapatos em todo o mundo, ocorrendo em seis continentes e

sendo responsável por grave morbidade e mortalidade em regiões temperadas, subtropicais e tropicais (PALMER, 1989). A doença é endêmica na América Latina, onde o principal vetor é o carrapato *Rhipicephalus microplus* (VIDOTTO et al., 1998). A soroprevalência de *A. marginale* varia amplamente entre os países das Américas e para o desenvolvimento de regiões geograficamente estáveis.

Para a implementação de um programa de controle da anaplasnose, faz-se necessário o conhecimento epidemiológico desta enfermidade (SOUZA et al., 2001). A situação epidemiológica de uma área pode ser determinada a partir de métodos de diagnósticos. Entre os mais práticos e eficazes está o Ensaio de Imunoadsorção Enzimática indireto (iELISA), que possui melhor desempenho quando comparado a outros métodos sorológicos (ARAÚJO et al., 1998). De acordo com os níveis de imunidade dos animais, as áreas podem ser caracterizadas de três formas: áreas de estabilidade enzoótica, instabilidade enzoótica e situação de área marginal (KESSLER et al., 1992).

Embora *A. marginale* apresente ampla distribuição em muitas regiões fisiográficas do Brasil não se conhece a condição epidemiológica da anaplasnose e a situação do estado do Rio de Janeiro (SOUZA et al., 2001). Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a prevalência e a condição soropidemiológica para *A. marginale* em bezerros nativos da Baixada Fluminense, estado do Rio de Janeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas a campo foram realizadas entre outubro de 2009 e dezembro de 2010, no setor de bovinocultura de leite da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO), Centro Estadual de Pesquisa em Agricultura Orgânica (Seropédica-RJ), antiga Estação Experimental de Seropédica, localizada na microrregião metropolitana da cidade do Rio de Janeiro (latitude sul 22° 48', longitude oeste 43° 41', altitude de 33m).

Foram utilizadas 41 bezerras (*Bos taurus* x *Bos indicus*) fêmeas, sendo 21 no período chuvoso (Outubro – Março, Grupo A) e 20 ao seco (Abril – Setembro, Grupo B). Os animais foram acompanhados em média a cada três dias até que completassem 90 dias, intervalos de 7 dias por até 150 dias e por fim intervalos a cada 15 dias até que os animais completassem os 180 dias de vida. Posteriormente, os animais foram estratificados em 04 grupos, sendo o primeiro com idade até 30 dias, o segundo entre 30 e 60, o terceiro entre 60 e 120 e o quarto entre 120 e 180 dias.

Para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale* em amostras de soro sanguíneo foi utilizado o teste iELISA segundo Machado et al. (1997) para *Babesia bovis*, adaptado para *A. marginale*. Como controles positivos, foram utilizados soros de bovinos mantidos com alto título de anticorpos anti-*A. marginale* e como controles negativos, soros de bezerros comprovadamente negativos. Foi utilizado antígeno total (MSPs) de *A. marginale* com concentração protéica de 12 µg/ml. A leitura foi realizada em leitor de microplacas, em comprimento de onda de 405nm.

A atividade enzimática de cada soro no iELISA foi calculada mediante determinação do valor da amostra em relação ao referencial positivo (A/P). Os valores A/P foram agrupados em níveis ELISA (NE), que variaram de zero a nove (0 - 9). A amplitude máxima do NE zero foi determinada pela média dos valores em absorvância de soro de animais não imunes contra *A. marginale* (referência negativa), acrescido de dois desvios padrão da média, conforme estabelecido por Machado et al. (1997). A partir deste limite, os intervalos entre os outros níveis no ELISA foram acrescidos de 35% cada. O ponto de corte do teste foi determinado multiplicando-se por 2,5 a média da densidade óptica (DO) de soros de animais negativos para *A. marginale*.

Para efeito de classificação das áreas, foram utilizados os critérios propostos por Mahoney; Ross (1972), que caracterizaram como estabilidade enzoótica as áreas cujos

rebanhos possuem freqüência de anticorpos acima de 75%, áreas de instabilidade enzoótica, aquelas com freqüência inferiores a 75%, e áreas marginais aquelas cujas freqüências estão muito próximas do limite.

Os resultados da associação entre a variável freqüência de animais soropositivos para *A. marginale* com o fator idade, foram submetidos ao teste de qui-quadrado (χ^2). Para avaliar o risco de ocorrência de anaplasnose, foi calculada a razão de prevalência. Para a análise dos dados, foi utilizado o software estatístico Rstudio (Foundation for Statistical Computing), version 2.12.2 (2011). Os gráficos foram preparados através do software estatístico Graph Pad (Prism®) versão 4.0 (2003), ambos em versões gratuitas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada absorvância média de $1,006 \pm 0,251$ para os controles positivos ($n=18$) e $0,117 \pm 0,004$ para os controles negativos ($n=18$). Assim, animais com DO superior a 0,292 (NE = 3) foram considerados positivos. Baseado na média da absorvância dos controles negativos foi estabelecido o primeiro NE, sendo os demais níveis determinados pelo acréscimo de 35% sobre o nível anterior (Tabela 1).

Dentre as amostras avaliadas, 1.0% (16/1607) apresentaram DO alta (NE = 7, 8 e 9) e 23.2% (373/1607) corresponderam ao nível de ELISA mais baixo (NE = 0).

As amostras de soro de animais até 30 e de 30 a 60 dias apresentaram positividade entre NE 0 – 5. Este fato se justifica porque as imunoglobulinas clostrais de ruminantes e apresentam níveis elevados após 24 horas do parto (LAMOTTE, 1977) e possuem meia-vida entre 11,5 e 16 dias (BARRINGTON E PARISH, 2001). Os bezerros recém-nascidos são capazes de manifestar resposta imune inata e adquirida, já que a resposta primária é lenta e a quantidade de anticorpos produzida é menor em comparação com animais adultos

(RADOSTITS et al., 1999). Por isso, a assistência imunológica materna através do colostro é essencial (PALMER, 1989).

As amostras de 60 – 120 dias mostraram maior prevalência (206) em NE igual a zero (Figura 1). Este fato se justifica pela queda nos níveis de anticorpos colostrais atingindo valores não detectáveis (NE = 0) ao redor de 60 dias (LAMOTTE, 1977).

Durante os primeiros 180 dias de vida a prevalência de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale* foi baixa (31.4%), caracterizando esta fase como de risco para a ocorrência de anaplasnose (Tabela 2). Animais entre 30 e 60 dias de idade apresentaram maior risco para anaplasnose (RP=1,9). Posteriormente, animais com idade entre 60 - 120 e 120 - 180 dias apresentaram respectivamente 76% e 55% mais risco de serem soronegativos para *A. marginale* do que animais recém nascidos.

Poucas áreas do Brasil, até o momento, foram caracterizadas como de instabilidade para *A. marginale*. Entre elas, o estado de Sergipe para as regiões climáticas do tipo árida, semi-árida, transição semi-árida e transição subúmida, onde a prevalência média foi de 16,30% (OLIVEIRA et al., 1992). A microrregião de Bagé, estado do Rio Grande do Sul /e a região nordeste do estado do Pará na qual a prevalência observada de animais reagentes para *A. marginale* foi de 64,00 e menor de 70% respectivamente (ARTILES et al., 1995, GUEDES JR et al., 2008).

A soroprevalência foi aumentando quanto mais velhos os animais se tornavam, corroborando com estudos anteriores realizados no Brasil e Costa Rica (PÉREZ et al., 1994). Animais jovens provavelmente são infectados cedo, mas a provável falta de reinfestação constante por *R. microplus* torna os adultos suscetíveis à anaplasnose. É importante esclarecer que na propriedade estudada animais mais jovens não são expostos à infestação por carrapatos, pois são mantidos em estábulos até os 30 dias de idade.

A idade é um fator determinante para a imunidade dos animais anti-*A. marginale*, uma vez que os animais jovens são mais resistentes à infecção primária, e se pelo menos 75% dos bezerros forem expostos à infecção entre 6 a 9 meses de idade, a incidência da doença será muito baixa e um estado de estabilidade endêmica natural existirá (MAHONEY & ROSS, 1972).

A soroprevalência de *A. marginale* aumenta com a idade dos animais (TEMBUE et al., 2011). Madruga et al. (1985) observaram em seus estudos que, três dias após o nascimento 36% dos bezerros são soronegativos para anticorpos anti-*A. marginale*, com redução para 13,3% aos 15 dias de vida. Esses autores relataram que as primeiras riquetsemias foram observadas a partir dos 30 dias de idade, sugerindo uma primo-infecção nos primeiros dias de vida, neste mesmo estudo, as maiores riquetsemias foram observadas entre 60 e 120 dias de vida.

Segundo Melo et al. (2001), mais de 90% dos bezerros apresentam anticorpos anti-*A. marginale* antes dos 30 dias de idade, sendo que, dos três aos cinco meses, estes valores caem até atingirem um mínimo de 13,6% e a partir dos seis meses de idade, por conta da primo-infecção mais de 96% tornam-se positivos novamente.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que os animais estudados apresentaram baixos títulos de anticorpos anti-*A. marginale*, sendo propensos a desenvolverem anaplasmose clínica no futuro.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio

financeiro. A professora Dr. Rosangela Zacarias Machado pela gentileza em ceder o antígeno (MSPs) de *Anaplasma marginale*.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, F.R. et al. Frequência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.50, p.243-246, 1998.

ARTILES, J. et al. Prevalência de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* no município de Bagé, RS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.4, Supl.1, p.179, 1995.

KESSLER, R.H. et al. Tristeza parasitária dos bovinos (TPB). In: CHARLES, T.P., FURLONG, J. **Doenças parasitárias dos bovinos de leite**. Coronel Pacheco, MG: Embrapa-CNPGL, 1992. p.1-30.

GUEDES JR, D.S. et al. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 105-109, 2008. Disponível em: < http://cbpv.com.br/rbpv/busca_volume.php?exemplar=63&volume=17> Acesso em: 15 out. 2009.

MACHADO, R.Z. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v.71, p.17-26, 1997. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00003-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00003-4) > Acesso em: 28 nov. 2008. doi: 10.1016/S0304-4017(97)00003-4.

MADRUGA, C.R. et al. Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça nelore, ibagé e cruzamentos de nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, p.135-142, 1985.

MAHONEY D.F.; ROSS D.R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 48, p.292-298, 1972. doi: 10.1111/j.1751-0813.1972.tb05160.x.

MELO, V.S.P. et al. Natural infection off calves by *Anaplasma marginle* in dairy Herds off the Metalúrgica Region, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.146-150, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2001000400004>> Acesso em: 28 nov. 2008. doi: 10.1590/S0100-736X2001000400004

OLIVEIRA, A.A. et al. Doenças de bezerro. II Epidemiologia da anaplasnose no estado de Sergipe. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**,v. 44, p.377-386, 1992.

PEREZ, E. et al. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Costa Rica. **Preventive Veterinary Medicine**, v.20, p.23-31, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167587794901058>> Acesso em: 28 nov. 2008. doi: 10.1016/0167-5877(94)90105-8.

SOUZA, J.C.P. et al. Prevalência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na Mesorregião do Médio Paraíba. **Ciência Rural**, v.31, p.309-314, 2001. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cr/v31n2/a19v31n2.pdf> > Acesso em: 15 jul. 2010.

TEMBUE, A.A.M. et al. Seroprevalence of IgG antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle from south Mozambique. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, p.1-7, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000400011> > doi: 10.1590/S1984-29612011000400011. Acesso em: 30 jan. 2012

VIDOTTO, O. et al. Evaluation of a frozen trivalent attenuated vaccine against babesiosis and anaplasmosis in Brazil. **Annals of Academic of Science fo New York**, v.849, p.420-423, 1998. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb11086.x.

Tabela1. Classificação dos soros testes A/P (amostra/positivo) em NE (Níveis de Elisa) variando de 0-9.

| NE | S/P | Grupo A | Grupo B |
|----|---------------|---------|---------|
| 0 | 1.0 - 0.140 | 207 | 195 |
| 1 | 0.142 - 0.189 | 165 | 171 |
| 2 | 0.191 - 0.256 | 173 | 189 |
| 3 | 0.258 - 0.346 | 144 | 123 |
| 4 | 0.348 - 0.468 | 90 | 85 |
| 5 | 0.470 - 0.633 | 67 | 56 |
| 6 | 0.635 - 0.855 | 37 | 19 |
| 7 | 0.857 - 1.155 | 10 | 7 |
| 8 | 1.157 - 1.560 | 1 | 1 |
| 9 | > 1.560 | 0 | 0 |

NE = Níveis de Elisa; S/P = Absorbância das amostras e dos soros de referência positiva

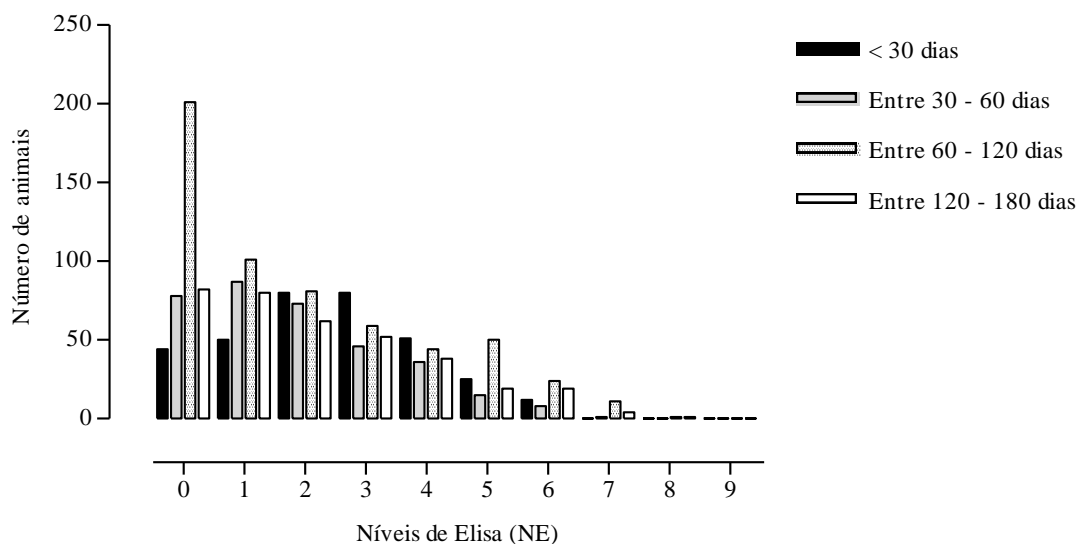


Figura 2. Número de amostras de soro de bezerros mantidas em área infestada por *Rhipicephalus microplus*, testados por iELISA anti-*Anaplasma marginale* e classificadas em Níveis de ELISA (NE).

Tabela 2. Avaliação da idade como fator de risco para a frequência de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* pelo teste de qui-quadrado, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, 2009 - 2010.

| Fator de risco | N | P(%) | χ^2 | RP | P-valor | IC95% |
|-------------------|-----|--------|----------|------|---------|---------------|
| Idade | | | | | | |
| (1) < 30 dias* | 342 | 39.8 % | - | - | - | - |
| (2) 30 – 60 dias | 344 | 23.3 % | 16.8 | 1.90 | 0.03 | [0.47 – 0.93] |
| (3) 60 – 120 dias | 583 | 27.3 % | 9.4 | 1.76 | 0.04 | [0.74 – 0.87] |
| (4) 120 180 dias | 338 | 38.2 % | 1.7 | 1.55 | 0.06 | [0.27 – 1.98] |

* Valor referência, N= número de amostras avaliadas, P(%)= prevalência de soropositivos para *Anaplasma marginale*, χ^2 = qui-quadrada, RP = razão de prevalência, IC 95%= intervalo de confiança

8 ANEXOS

Anexo A – Protocolo de i-ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Anaplasma marginale* adaptado de Machado et al., 1997.

1. Sensibilizar a placa (Nunclon™ surface) com o antígeno na concentração ótima de 10 µg/mL, diluindo-o em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. Adicionar **100 µL/poço**, exceto no branco da placa.
2. Incubar “overnight” em câmara úmida (a 4°C – geladeira).
3. Lavar 3x com PBS Tween® 20. Secar bem a placa.
4. Bloquear com solução PBS Tween 20 + 6% de leite em pó desnatado (Molico®), adicionando **200 µL/poço**.
5. Incubar em câmara úmida, a 37°C, durante 1 hora e 30 minutos.
6. Lavar 3x com PBS Tween® 20. Secar bem a placa.
7. Diluir os soros em PBS Tween® 20 + 5% de leite em pó desnatado (Molico®), na diluição de 1:200. Colocar **100 µL/poço**.
8. Incubar em câmara úmida, a 37°C, por 1 hora e 30 minutos.
9. Lavar 3x com PBS Tween® 20. Secar bem a placa.
10. Adicionar o conjugado anti-bovino diluído em PBS Tween 20 + 5% de leite em pó desnatado (Molico®), colocando **100 µL/poço**.
 - Conjugado Sigma® (anti-bovino IgG alkaline phosphatase conjugate) diluição foi ajustada para 1:25.000. (Obs.: diluição recomendada pelo fabricante 1:30.000)
11. Incubar em câmara úmida, a 37°C, por 1 hora e 30 minutos.
12. Lavar 3x com PBS Tween® 20. Secar bem a placa.
13. Adicionar o substrato para possível reação com a fosfatase alcalina, paranitrofenilfosfato (pNPP), colocando **100 µL/poço**.
 - Diluir 2 comprimidos do substrato (5mg/ comprimido) em 10 mL de tampão dietanolamina pH 9,8. Usar frasco escuro ou enrolar em papel alumínio. Cuidado ao usar a multicanal, pois poderá faltar substrato nos últimos poços.
14. Incubar a reação por 30 minutos à temperatura ambiente.
15. Fazer leitura em espectrofotômetro de placas utilizando um filtro de 405 nm.

Anexo B - Soluções utilizadas no i-ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Anaplasma marginale* adaptado de Machado et al., 1997

PBS TWEEN® 20 pH 7,4 – 0,01M

Preparar as 3 soluções-estoque **separadamente** (1.0 L cada): Na₂HPO₄ (0,2M), NaH₂PO₄ (0,2M) e NaCl (1,4M).

| Solução-estoque | | Solução-uso (PBS Tween® 20) | |
|--|------------------|-----------------------------|--------|
| | | 1X | 2X |
| Na ₂ HPO ₄ (0,2M) | 28,39 g (anidro) | | |
| ou | ou | | |
| Na ₂ HPO ₄ + 7H ₂ O | 53,61 g | 40,5 mL | 81 mL |
| NaH ₂ PO ₄ (0,2M) | 27,6 g | 4,4, mL | 8,8 mL |
| NaCl (1,4M) | 81,82 g | 100 mL | 200 mL |
| q.s.p. | 1 L | 1 L | 2 L |

Antes de completar o volume para 1 L da solução-uso, adicionar 0,5 mL de Tween 20 e verificar o pH.

TAMPÃO DIETANOLAMINA (pH 9,8)

| | |
|---|--------|
| *Dietanolamina (usar luvas ao manuseio)..... | 20 mL |
| *MgCl ₂ anidro..... | 0,02 g |
| ou MgCl ₂ + 6H ₂ O..... | 0,04 g |
| *água destilada q.s.p. | 200 mL |

Ajustar pH com Ácido Clorídrico (HCl) 5N e adicionar 0,2 mL (10%) de Azida Sódica (NaN₃).

TAMPÃO CARBONATO-BICARBONATO DE SÓDIO (pH 9,6), válido por 1 mês

| | |
|---------------------------------------|----------|
| Na ₂ CO ₃ | 0,3975 g |
| NaHCO ₃ | 0,7325 g |
| NaN ₃ 10%..... | 0,5 mL |
| Água destilada q.s.p. | 250 mL |

Ajustar o pH com Ácido Cítrico (C₆H₈O₇) 1N.

Anexo C - Protocolo para extração de DNA, adaptado de Sambrook et al., 1989.

Os procedimentos são realizados em temperatura ambiente.

- Descongelar e homogeneizar a amostra de sangue;
- Pipetar 200 µL de sangue em tubo de polipropileno (estéril) para microcentrifuga (2 mL);
- Adicionar 300 µL de Dodecil Sufato de Sódio (SDS) 10% e homogeneizar em *vortex*;
- Adicionar 15 µL de Protease K (20 mg/mL), homogeneizar em *vortex* e incubar a 56°C por 30 minutos em banho-maria;
- Adicionar 500 µL de clorofórmio e homogeneizar em *vortex*. A porção líquida deve fluir livremente e apresentar um aspecto de partículas “cobertas de chocolate”.
- Adicionar 200 µL da solução de precipitação proteica e homogeneizar em *vortex*, até a amostra tornar-se uniformemente viscosa;
- Centrifugar a velocidade máxima (16000 rpm) por 5 minutos;
- Pipetar a fase aquosa (400µL) para um novo tubo de polipropileno estéril (1,5 mL);
- Adicionar 1 mL de etanol absoluto a temperatura - 20°C e homogeneizar por inversão até formar um precipitado, que deverá ser visto entre 30 e 60 segundos;
- Se o precipitado não for visualizado, armazenar a temperatura - 20°C por 10 minutos;
- Centrifugar a velocidade máxima (16000 rpm) por 5 minutos;
- Desprezar o sobrenadante e adicionar 1 mL de etanol 70% a temperatura - 20°C;
- Centrifugar em velocidade máxima (16000 rpm) por 2 minutos;
- Desprezar novamente o sobrenadante, remover resíduos de etanol com o auxílio de uma pipeta e inverter os tubos para secagem (pode ser em estufa a 37°C);
- Adicionar 120 µL de água ultrapura ou tris-EDTA (TE) em cada tubo e homogeneizar levemente com pipeta;
- Incubar a 56°C por 5 minutos em banho-maria;

Obs.: Manter em geladeira por 24 hs e após acondicionar em freezer (-20°C) até a realização dos testes.

Reagentes:

Acetato de potássio 5M

- Pesar 4.9 g de acetato de potássio
- Água destilada q.s.p. 10 mL

Solução de precipitação proteica

- 6 mL de acetato de potássio 5 M
- 1.1 mL de ácido acético glacial
- 2.9 mL de água destilada

Solução Dodecil Sufato de Sódio - SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) a 10%

Referência bibliográfica

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, vol. I. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Anexo D - Protocolo da PCR para *Anaplasma marginale* (msp5), adaptado de Torioni de Echaide et al., 1998.

PCR para *Anaplasma marginale* (MSP5)

PRIMERS:

msp5 F 5' - TAG CCT CCG CGT CTT TC - 3'

msp5 R 5' - TCC TCG CCT TGC CCC TCA GA - 3'

Ressuspender primers em água ultra-pura estéril (Q) para uma concentração final de 15 pmols/μl (15μM)

MISTURA DE REAÇÃO:

4 μl DNA

0.8 μl Primer F x _____ amostras = _____

0.8 μl Primer R x _____ amostras = _____

4.0 μl Tampão 5X Green Flexi (Promega®) x _____ amostras = _____

2.4 μl MgCl₂ (25mM) x _____ amostras = _____

0.8 μl DNTP (10mM) x _____ amostras = _____

0.1 μl Taq (Invitrogen®) x _____ amostras = _____

7.1 μl Q x _____ amostras = _____

Adicione 16 μl do MIX na lateral do tubo de PCR e, em seguida, 4 μl de DNA.

PROGRAMA DO PCR

95°C 3'

Ciclos (35): 95°C 30", 65°C 58", 72°C 30"

72°C 10'

4°C ∞

Eletroforese em gel de agarose 1.5%, 100mA, 45', corado com SyBr safe® (Invitrogen®) Tamanho do Produto: 458 bp

DATA: ____/____/____

AMOSTRAS TESTADAS: _____