

## ASPECTOS DA INFECÇÃO POR *Anaplasma marginale* EM BOVINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

Welber Daniel Zanetti Lopes<sup>1</sup>  
João Ricardo de Souza Martins<sup>2</sup>  
Alvimar José Costa<sup>3</sup>  
Vando Edesio Soares<sup>4</sup>  
Weslen Fabricio Teixeira<sup>3</sup>  
Breno Cayeiro Cruz<sup>3</sup>  
Willian Maciel<sup>3</sup>  
Gustavo Felippelli<sup>3</sup>  
Rafael Silveira Carvalho<sup>5</sup>

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo, avaliar os aspectos clínicos, hematológicos, parasitológicos, bem como a eficácia da oxitetraciclina longa ação, contra *Anaplasma marginale*, em bovinos experimentalmente infectados. Seis animais soronegativos foram obtidos pela RIFI. No dia 9 do estudo, três animais foram esplenectomizados, e no dia zero, os seis bovinos foram inoculados com aproximadamente  $1 \times 10^6$  hemácias parasitadas por *Anaplasma marginale*. A temperatura retal foi aferida do 1º ao 35º dia pós-inoculação (DPI). Já o volume globular (VG - microhematócrito) e o cálculo da parasitemia, foram obtidos do 10º ao 35º DPI. Os animais receberam tratamento específico (oxitetraciclina LA), quando apresentaram, inicialmente, hipertermia ( $\geq 39,2^\circ\text{C}$ ) e parasitemia  $\geq 2,0\%$ , e receberiam novos tratamentos, até ocorrer estabilização clínica e parasitológica do animal. Analisando os resultados, verifica-se que no 21º DPI a parasitemia foi presente nos seis animais, neste mesmo dia, iniciou o decréscimo no VG dos animais. A temperatura retal dos bovinos atingiu picos febris  $\geq 39,2$ , a partir do 23º DPI, dia este em que a parasitemia encontrava-se em ascensão. De um modo geral, o tratamento específico contra *A. marginale*, precisou ser realizado cerca de três dias após o hemoparasita ter sido identificado na corrente sanguínea periférica dos animais. Os animais tiveram de receber de um a quatro tratamentos específicos contra *A. marginale* para a estabilização do quadro clínico/parasitológico dos animais. Não houve eliminação total dos parasitas após os tratamentos. Com base no modelo experimental utilizado neste estudo, pode-se concluir-se que, os bovinos necessitaram do primeiro tratamento específico contra *A. marginale*, cerca de 72 horas após a detecção direta do parasita em lâminas. Foram necessários, de um a quatro tratamentos para a recuperação clínica e a diminuição parasitológica do agente nos animais. Além disso, o período pré-patente e conseqüentemente o de incubação para esta enfermidade foi, em média, de 21 dias, entretanto, este período pode se estender, um pouco mais, de acordo com a quantidade de inóculo utilizado ou também a via de administração utilizada para infectar os bovinos.

**Palavras-chave:** Anaplasmosose, oxitetraciclina, tristeza parasitária bovina, parasitemia.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Goiás. Contato principal para correspondência.

<sup>2</sup> Instituto de Pesquisas Desidério Finamor.

<sup>3</sup> Universidade Estadual Paulista.

<sup>4</sup> UNICASTELO.

<sup>5</sup> Universidade Estadual de Maringá.

## ASPECTS OF INFECTION IN CATTLE EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Anaplasma marginale*

### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the clinical, hematological, parasitological aspects and the effectiveness of long-acting oxytetracycline against *Anaplasma marginale* in experimentally infected cattle. Six 10-month-old animals seronegative by indirect immunofluorescence reaction (IFAT) were obtained. On day -9 of the study, three animals were splenectomized, and on day zero all six animals were inoculated with about  $1 \times 10^6$  by *Anaplasma marginale* parasitized erythrocytes. Rectal temperature was measured from the 1<sup>st</sup> to the 35<sup>th</sup> day post-inoculation (DPI). The packed cell volume (VG - microhematocrit) and calculation of parasitemia was obtained from 10<sup>o</sup> to 35<sup>o</sup> DPI. The experimental animals received first specific treatment (oxytetracycline LA) when they presented hyperthermia ( $\geq 39.2^\circ\text{C}$ ) and parasitemia  $\geq 2.0\%$ , and received new treatments until clinical and parasitological stabilization occurred. The results revealed that on 21<sup>o</sup> DPI parasitemia was present in the six animals, and from this day on the VG decreased. Their rectal temperature reached  $\geq 39.2^\circ\text{C}$  from 23<sup>o</sup> DPI on, when the parasitemia was on the rise. In general, the specific treatment against *A. marginale* had to be performed about three days after the haemoparasite was identified in the blood. The animals received one to four specific treatments against *A. marginale* to obtain clinical and parasitological stabilization. The parasite was not totally eliminated after the treatments. Based on the experimental model used in this study, one can conclude that the specific treatment required against *A. marginale* had to start about 72 hours after detection of the parasite on the cover slips. One to four treatments were required for clinical recovery of the animals and parasitological reduction of the infection. The incubation period for the disease was on average 21 days; however, this period may extend more, according to the amount of inoculum or the route of administration used to infect the cattle.

**Keywords:** Anaplasmosis, oxytetracycline, tick fever, parasitemia.

## ASPECTOS DE LA INFECCIÓN EN GANADO EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR *Anaplasma marginale*

### RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo evaluar las características clínicas, hematológicas, aspectos parasitológicos, así como la eficacia de oxitetraciclina de larga acción contra *Anaplasma marginale* en el ganado infectado experimentalmente. Seis animales seronegativos fueron obtenidos por RIFI. En día 9 del estudio, los tres animales fueron esplenectomizados, y de día cero, seis animales fueron inoculados con aproximadamente  $1 \times 10^6$  glóbulos rojos parasitados por *Anaplasma marginale*. La temperatura rectal se midió desde el primero al 35<sup>o</sup> día después de la inoculación (DPI). Haga que el volumen celular empacado (VG - microhematocrito) y el cálculo de la parasitemia, fueron obtenidos a partir de la 10<sup>a</sup> a la 35<sup>a</sup> DPI. Los animales recibieron un tratamiento específico (oxitetraciclina LA), cuando se presenta inicialmente la hipertermia ( $\geq 39,2^\circ\text{C}$ ) y la parasitemia  $\geq 2,0\%$ , y recibir nuevos tratamientos, clínicos y parasitológicos hasta que se produce la estabilización del animal. Analizando los resultados, parece que a los 21 DPI la parasitemia estaba presente en seis animales, en el mismo día, comenzó el declive de VG en el ganado. La temperatura rectal del ganado alcanzó fiebre  $\geq 39,2$  picos del 23 DPI, en este día que la parasitemia de los animales se encontraban en el lugar. En general, el tratamiento específico para *A. marginale*, se tuvo que realizar unos tres

días después de esta hemoparásito se han identificado en la sangre periférica de los animales. Los animales habían recibido uno a cuatro tratamientos específicos contra *A. marginale* para la estabilización de los animales clínicos/parasitológica. Hubo total eliminación de los parásitos después del tratamiento requiere el primer tratamiento específico para *A. marginale*, aproximadamente 72 horas después de la detección directa del parásito en las cuchillas. Se tomó entre uno y cuatro tratamientos para la recuperación clínica y reducción parasitológica en los animales. Además, el período de pre - patente y por lo tanto la incubación de esta enfermedad fue, en promedio, 21 días, sin embargo, este período puede extender un poco más de acuerdo con la cantidad de inóculo usado o también la ruta de administración utilizó para infectar el ganado.

**Palabras clave:** Anaplasmosis, oxitetraciclina, fiebre por garrapatas del ganado, parasitemia.

## INTRODUÇÃO

Os carrapatos e as doenças que estes ectoparasitos podem transmitir aos bovinos são um dos maiores obstáculos da pecuária nas regiões tropical e subtropical do mundo. Dentro deste contexto, a anaplasmosose e a babesiose popularmente conhecidas no Brasil como “Tristeza Parasitária Bovina (TPB)”, pode ser desencadeada por protozoários (*Babesia bovis* e *Babesia bigemina*) ou riquetsias (*Anaplasma* spp.). No gênero *Anaplasma* existem duas espécies, *Anaplasma centrale* agente causador da anaplasmosose benigna e com pouca importância/distribuição, e a *Anaplasma marginale*, espécie responsável pela doença maligna em bovinos e de elevada importância/distribuição em medicina veterinária (1).

Descrita pela primeira vez por THEILER, em 1910, na África do Sul, *A. marginale* é uma bactéria gram-negativa, que por sua vez, pertence à Ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae. Organismos pertencentes a esta família, são parasitas intracelulares obrigatórios encontrados exclusivamente em vacúolos no citoplasma das células hospedeiras, formados pela invaginação da membrana celular destas (2,3).

Algumas características biológicas de *A. marginale*, ainda são bastante discutidas. Sua transmissão para os bovinos, no Brasil, ocorre principalmente por meio de vetores mecânicos (moscas hematófagas) e biológicos [*R.(B.) microplus*]. Entretanto, recentes estudos evidenciam que a transmissão por meio do vetor biológico seja mais efetiva que a transmissão mecânica (4). Além disso, alguns autores acreditam que o *R. (B.) microplus* é o principal e único vetor biológico desta enfermidade no país (5,6), por outro lado, outros pesquisadores acreditam que esta espécie de carrapato parece não ser um vetor biológico para o *A. marginale* (7,8). A anaplasmosose pode, ainda, ser transmitida de forma iatrogênica (9) ou transplacentária (10).

Considerando a transmissão desta riquetsia para o carrapato bovino [*R.(B.) microplus*], esta pode ocorrer de forma interestadial ou transestadial (infecção em um estádio e transmissão no seguinte), sendo neste caso, o carrapato macho de elevada importância na transmissão desta enfermidade, uma vez que este pode se deslocar de um hospedeiro para o outro mais facilmente que a fêmeas, durante sua vida parasitária. A transmissão transovariana de *A. marginale* para *Rhipicephalus (B.) microplus* é outro motivo de discussão. Alguns estudos relatam que este tipo de transmissão não ocorre (11,12), por outro lado, (13,14) evidenciaram que, tanto larvas provenientes de pastagens de áreas endêmicas, quanto teleóginas alimentadas em animais positivos, foram diagnosticadas como positivas para *A. marginale*. Além disso, alguns pesquisadores conseguiram isolar *A. marginale* em ovos e larvas (1), ou apenas de larvas (14), de teleóginas colhidas de animais com riquetsemia, pela “Nested” PCR e PCR, respectivamente. Tais resultados representam um forte indício de que possa ocorrer a transmissão transovariana deste agente, em *R. (B.) microplus*.

Sua distribuição geográfica se dá em regiões de clima tropical, sub-tropical, como em zonas de clima temperado (15). Nos Estados Unidos, os prejuízos ocasionados por esta hemoparasitose são na ordem de 100 milhões de dólares anuais (16). No Brasil, não foram realizados estudos específicos com essa informação, entretanto, de acordo com (17,18) a anaplasmose, juntamente com a babesiose são uma das, senão a maior causa de mortalidade de bezerros em diversas regiões deste país, ocasionando problemas tanto em áreas de estabilidade enzoótica (prevalência  $\geq 90\%$  do rebanho), quanto em áreas de instabilidade enzoótica (prevalência  $\leq 25\%$  do rebanho) para esta enfermidade no país.

Levando em consideração a elevada morbidade desta enfermidade na maior parte do rebanho bovino nacional, aliado ao enorme prejuízo que a anaplasmose pode ocasionar para os produtores, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar os aspectos clínicos, hematológicos, parasitológicos, bem como a eficácia da oxitetraciclina longa ação (LA) contra *A. marginale*, em bovinos experimentalmente infectados.

## MATERIAL E MÉTODOS

A fim de selecionar seis animais soronegativos contra *Anaplasma marginale*, amostras de sangue foram colhidas, em tubos sem anticoagulante, de bovinos (10 meses de idade) em uma propriedade rural naturalmente livre de carrapatos, localizada no município de Santa Vitória do Palmar, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Os soros foram submetidos à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*A. marginale* da classe IgG (19). Em todas as reações foram incluídos soros padrões, positivo e negativo, previamente conhecidos. A leitura foi realizada em microscópio de imunofluorescência e a positividade foi considerada como maior ou igual a 1:80. Na sequência, seis animais soronegativos (RIFI) foram transportados para baias individuais, pertencentes ao Instituto de Pesquisas Veterinárias “Desidério Finamor”, no D-17 do estudo para adaptação, onde o experimento foi realizado. É importante frisar que, as baias onde os animais permaneceram são teladas, garantindo desta forma o isolamento dos bovinos quanto à presença de possíveis insetos e carrapatos sobre os bovinos.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Pesquisas em Saúde Animal/IPESA, Formiga/MG, sob o protocolo n. PP 004E5/2012.

No dia 9 do estudo, três bovinos foram aleatoriamente escolhidos para serem submetidos ao processo de esplenectomia e os outros três mantiveram-se com seus baços. Tal procedimento foi realizado de acordo com as recomendações descritas na Portaria 48 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (20) e também por Coetzee et al. (21). Para realização do processo cirúrgico, foi administrado cloridrato de xilazina 2g (1,5mL/100kg), pela via intramuscular, como sedativo. Quando os bovinos estivessem sedados, administrou-se 40mL de lidocaína à 2% no local da incisão (22). Na sequência, retirou-se o baço dos animais pré-selecionados.

No dia zero do estudo, todos os seis animais foram inoculados, pela via endovenosa (veia jugular), com aproximadamente  $1 \times 10^6$  hemácias parasitadas por uma cepa altamente virulenta de *A. marginale*, mantida junto ao IPVDF.

A partir do dia zero (pela manhã) até o 20º dia pós-inoculação, a temperatura retal dos animais foi aferida uma vez ao dia. Do 21º até o término do estudo (D+35), tal procedimento foi realizado duas vezes ao dia, com intervalo de aproximadamente 12 horas entre as aferições. Além disso, nesta mesma periodicidade, os animais foram observados, mas sem se limitar a isso, quanto à aparência física geral e do comportamento, anormalidades no consumo de alimento e água e aparência da urina e das fezes, ou qualquer outro sinal clínico que possivelmente estivesse relacionado com a enfermidade em questão.

A partir do D+10 até o D+20 pós-inoculação, o volume globular dos animais foi determinado, por meio do microhematócrito, uma vez ao dia pela manhã. Do D+21 até o término do estudo (D+35), tal procedimento foi realizado duas vezes ao dia, com intervalo de aproximadamente 12 horas entre uma colheita de sangue e outra. Para realização de tal procedimento, aproximadamente 5mL de sangue, de cada animal, foi colhido da veia caudal, em tubo contendo anticoagulante (EDTA), para determinação do VG. No laboratório, as amostras foram homogeneizadas novamente e o sangue foi transferido para tubos “capilar” (tubo de microhematócrito) até o preenchimento de  $\frac{3}{4}$  do mesmo. Em seguida, cada tubo foi colocado em uma micro-centrífuga e logo após cinco minutos de centrifugação realizou-se a leitura do VG de cada animal, utilizando um cartão específico para o microhematócrito.

Na mesma periodicidade da determinação do volume globular, realizou-se colheitas de sangue para o cálculo da parasitemia. Para confecção do “esfregaço” sanguíneo/parasitemia, o sangue periférico caudal de cada bovino, foi colhido por meio de punção com agulha esterilizada, de onde se extraiu uma gota que foi imediatamente colocada em lâmina, para sofrer a “distensão” ou “esfregaço”, com o auxílio de outra lâmina. Em seguida, o “esfregaço” foi rapidamente secado (para que as hemácias permanecessem íntegras) por meio de movimentos rápidos com as mãos. No laboratório, realizou-se a fixação da lâmina em metanol (3 a 5 minutos), e em seguida a lâmina foi corada pelo método de coloração rápida, utilizando-se um kit comercial denominado de Instant-Prov®. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente a fim de remover o excesso dos corantes, e na sequência secadas em temperatura ambiente. O “esfregaço” sanguíneo, estando corado e seco, foi observado ao Microscópio Óptico em ocular 10x, com objetiva de 100x, em óleo de imersão, onde foi feita a pesquisa do agente em questão, e posterior cálculo da parasitemia (19).

Os animais foram tratados contra *A. marginale*, quando estes apresentassem, após a inoculação realizada no dia zero, hipertermia ( $\geq 39,2^{\circ}\text{C}$ ) e parasitemia  $\geq 2,0\%$ . Novo(s) tratamento(s) foi instituído até a normalização do quadro clínico de cada animal (parâmetros clínicos, hematológicos e parasitológicos).

Como tratamento específico, os animais receberam oxitetraciclina de longa ação (LA), 22mg/kg, pela via intramuscular profunda, conforme recomendação de bula. Imediatamente antes do tratamento de cada animal, os mesmos foram pesados, para cálculo da dosagem a ser administrada. Por questões de bem estar animal, os bovinos receberam, quando necessário, tratamento suporte (soro fisiológico e/ou transfusão sanguínea.).

Os dados experimentais foram submetidos aos testes de prerrogativas de normalidade, homocedacidade e de resíduos e analisados em um delineamento inteiramente casualizado e as médias dos dados experimentais foram confrontadas pelo teste t. Os valores observados de parasitemia não seguiram as prerrogativas de normalidade sendo submetidos a transformação de  $\log(x+1)$ . A análise de correlação de Pearson, com nível de 5% de significância, foi realizada com a finalidade de verificar a existência de correlação linear entre as variáveis temperatura retal, micro hematócrito e parasitemia.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliação da temperatura retal, os bovinos foram examinados de conforme os critérios estabelecidos por Terra (23) e Feitosa (24). De acordo com estes autores, a temperatura normal de bovinos oscila entre  $37,5^{\circ}\text{C}$  e  $39,2^{\circ}\text{C}$ , sendo desta forma, esta faixa adota como sinal de normotermia. Analisando-se a temperatura retal dos animais após estes terem sido inoculados com *Anaplasma marginale*, verificou-se que houve um aumento nos valores aferidos de alguns animais no 10º DPI. Fato este que ocorreu, possivelmente, em função do início das colheitas de sangue dos bovinos, o que por sua vez provocou estresse aos animais que estavam se adaptando a este manejo. Após isto, novo aumento médio de

temperatura, pode ser observado do 23° ao 26° DPI, sendo que alguns bovinos apresentaram, neste intervalo, valores de temperatura corporal (retal)  $\geq 40^{\circ}\text{C}$  (animal 3510 no 23° e 24° DPI; 3534 no 24° e 26° DPI; 3487 no 23° e 24° DPI e o bovino 3571 no 26° DPI). Nas demais datas, a média da temperatura retal demonstrada pelos animais, foi condizente com os valores descritos na literatura, de normometria, para a espécie animal em questão (Tabela 1). Apesar dos picos de hipertermia detectados, estatisticamente, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) nos valores médios aferidos dos animais ao longo do estudo (Tabela 2).

Os resultados de temperatura encontrados neste estudo, estão de acordo com os relatos de Palmer et al. (25). Estes autores relatam que, a febre dos animais parasitados pode ultrapassar valores de  $40^{\circ}\text{C}$ . O período pré-patente (incubação) desta infecção pode variar dependendo de vários fatores como dose infectante e também a via de administração desta dose. Este período pode variar de 7 a 60 dias (26).

Referente aos resultados obtidos no VG (%) dos animais, verifica-se que de um modo geral, os valores médios dos seis bovinos infectados experimentalmente com *A. marginale* do 10° ao 20° DPI, mantiveram-se entre 29% e 31%, sendo que, a partir do 21° DPI, a porcentagem declinou de 28,5% para 16,8% no 26° DPI. O valor do volume globular destes animais, voltaram a subir novamente, atingindo níveis acima de 29% a partir do 34° DPI (Tabela 1). Os resultados da análise estatística reforçam essa inferência (Tabela 2). Lopes et al. (27) inocularam pela via subcutânea, 10mL de sangue contendo o agente, em bovinos importados, sendo que, neste caso, os autores relataram decréscimo significativo do volume globular dos animais no 38° DPI, queda essa atribuída a *Anaplasma marginale*. O período de incubação de *A. marginale*, pode variar de 30 a 40 dias (28,29,30). No presente estudo, utilizando a via endovenosa, o período pré-patente/incubação médio para anaplasiose, foi de 21 dias, entretanto, o pico de parasitemia e os consequentes tratamentos específicos, foram realizados do 23° ao 26° DPI. O período pré-patente médio desta enfermidade é de 28 dias (31).

Em relação à porcentagem de *Anaplasma marginale* na corrente sanguínea periférica diagnosticada nos animais pelo “esfregaço” (parasitemia), foi possível observar que, o parasita em questão, foi diagnosticado em um animal (3510 - 0,80%), a partir do 19° DPI (Tabela 3). No 21° DPI, todos os seis animais encontravam-se parasitados por *A. marginale* na corrente sanguínea. De um modo geral, o aumento da parasitemia pode ser observado nos animais do 23° ao 26° DPI (Tabelas 1,2). Após esta data, os valores da parasitemia voltaram a decrescer em função do início do tratamento específico dos animais com oxitetraciclina LA, contra o *A. marginale*, conforme critério pré-estabelecido neste estudo.

Na Tabela 3, observa-se o dia exato em que se iniciou a parasitemia em cada animal, quando foi o início do tratamento específico com oxitetraciclina LA, bem como o número de tratamentos que cada bovino recebeu. Por esta Tabela, é possível verificar que, os animais precisaram receber de um a quatro tratamentos com a formulação supracitada. Cerca de 24 horas após a administração da oxitetraciclina, a temperatura retal dos animais havia se estabilizado, entretanto, alguns animais ainda apresentavam elevada parasitemia, e por este motivo, receberam nova dose desta formulação. Tal procedimento se repetiu, até que ocorreu um equilíbrio entre os valores de parasitemia, a temperatura retal e o micrihematócrito dos bovinos. Não houve eliminação total dos parasitas após os tratamentos. Convém salientar que, os animais que receberam maior número de tratamentos, foram os esplenectomizados (Tabela 3). De um modo geral, os tratamentos se iniciaram no 23° DPI e terminaram no 26° DPI. Além disso, foi necessário realizar tratamento suporte (transfusão sanguínea mais soroestimulante) em dois animais esplenectomizados (Bov. 3487 no 24° e 25° DPI e o Bov. 3488 no 24° DPI).

De um modo geral, o tratamento específico contra *A. marginale*, precisou ser realizado cerca de três dias após o hemoparasita ter sido identificado na corrente sanguínea periférica

dos animais. Além disso, o período de recuperação clínica/parasitológica dos bovinos, após o último tratamento, ocorreu cerca de dois a três dias para os animais não esplenectomizados e esplenectomizados, respectivamente (Tabela 3).

Os resultados obtidos em relação à eficácia da oxitetraciclina LA contra *A. marginale*, estão de acordo com os relatos de Kocan et al. (31). Estudos antigos reportam que a oxitetraciclina administrada endovenosa na dose de 22 mg/kg por cinco a sete dias consecutivos, “esterilizava” os animais quanto a presença de *A. marginale* (32,33). Por outro lado, outros estudos evidenciaram que a administração de oxitetraciclina, pela via intramuscular, na dose de 20mg/kg administrada em duas ou três ocasiões com intervalo de três a sete dias, foi suficiente para eliminar *A. marginale* dos bovinos infectados (32-37). De acordo com Kocan et al. (31), essas conclusões podem ser duvidosas, uma vez que, nos estudos supracitados, a remoção do parasita foi aferida por meio de teste de fixação de complemento que apresenta apenas 20% de sensibilidade. Os resultados obtidos nesses estudos realizados anteriormente podem gerar informações conflitantes. De acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (38), os animais oriundos de áreas com histórico para anaplasmose, podem ser exportados para áreas livres de carrapatos, desde que sejam respeitadas algumas diretrizes, sendo uma delas: animais deverão ser tratados com oxitetraciclina (22mg/kg), durante cinco dias consecutivos antes de serem transportados. Entretanto, estudos realizados demonstram que este protocolo não é suficiente para eliminar *A. marginale* dos bovinos no caso de estarem infectados (21). Os resultados encontrados nesse estudo reforçam essa afirmação.

A oxitetraciclina (de longa ação ou não), após alguns tratamentos, reduz a parasitemia, temperatura corporal e conseqüentemente recupera o volume globular dos animais, de modo que os bovinos se tornam portadores assintomáticos (31). Resultados semelhantes foram encontrados com a utilização da oxitetraciclina contra *A. marginale* (39-42) e também com a enrofloxacina (43). Entretanto, neste caso, a enrofloxacina apresentou redução da parasitemia e recuperação do VG mais rápida nos animais infectados, em comparação à oxitetraciclina LA.

Analisando esses três parâmetros em conjunto, de um modo geral, pode se observar que, a parasitemia no 21º DPI, estava presente nos seis animais, e neste mesmo dia, iniciou o decréscimo no VG. A temperatura retal atingiu picos febris  $\geq 39,2$ , a partir do 23º DPI, dia este em que a parasitemia encontrava-se em ascensão. É importante frisar que, o período de febre e o baixo volume globular, estão associados com o período de elevada parasitemia nos animais. Estas inferências são reforçadas, quando se verifica os resultados destes três parâmetros obtidos pela análise de correlação de Pearson (Tabela 4). Pela referida Tabela, é possível verificar correlação positiva entre os parâmetros temperatura retal x parasitemia e negativa para parasitemia x microhematócrito.

Os sinais clínicos observados do 23º ao 26º DPI foram: mucosas pálidas, ictéricas, diminuição no consumo de alimento, apatia, decúbito esternal, diarreia e sialorreia. Nesse caso, a diminuição no consumo de alimento, a apatia, o decúbito esternal, a diarreia e a sialorreia, foram mais evidentes nos animais esplenectomizados (Tabela 5). Os sinais clínicos encontrados, no presente estudo, nos animais durante a fase de elevada parasitemia, estão de acordo com os relatos da literatura (44-46). Na anaplasmose, a anemia, diferentemente da babesiose, ocorre em função das células parasitadas serem “sequestradas” e transportadas por células do sistema fagocitário mononuclear, que as destroem de forma extra-vascular. Na seqüência, a hemoglobina se desmembrará (sofrerá hemólise desencadeando anemia) nas porções heme e globina, sendo que, a porção heme se transformará em biliverdina e com auxílio da biliverdina redutase, em bilirrubina. Esta por sua vez, se conjugará a albumina, e via plasma atingirá o fígado, quando no fígado se conjugada ao ácido glicurônico, sendo denominada de bilirrubina conjugada. Em seguida, essa bilirrubina conjugada atinge o

duodeno, via colédoco, acaba sendo eliminada juntamente com as fezes. O problema existe quando ocorre uma sobrecarga hepática nos animais com parasitismo elevado, e neste caso, o excedente de bilirrubina é depositado nos tecidos, ocasionando a icterícia nos animais, sem hemoglobinemia e hemoglobinúria, que, por sua vez, são decorrentes da hemólise intravascular (47-49).

A diarreia observada principalmente nos animais esplenectomizados está de acordo com Boero (50) que relata que, em casos graves desta enfermidade, é possível observar alterações digestivas como diarreia seguida de desidratação nos animais altamente parasitados.

Tabela 1. Valores médios/amplitude de variação para as variáveis temperatura retal, volume globular e parasitemia de bovinos experimentalmente infectados com *Anaplasma marginale*.

Dia pós-inoculação	Parâmetro avaliado					
	Temperatura retal (°C)		Volume globular (%)		Parasitemia (%)	
	Valores médios	Amplitude de variação	Valores médios	Amplitude de variação	Valores médios	Amplitude de variação
10	38,8*	38,2 - 39,6	31,8	28,0 - 37,0	0,0	0,0 - 0,0
11	38,9	38,7 - 39,3	31,8	26,0 - 37,0	0,0	0,0 - 0,0
12	38,8	38,5 - 39,1	31,8	26,0 - 37,0	0,0	0,0 - 0,0
13	38,7	38,5 - 39,0	31,2	26,0 - 36,0	0,0	0,0 - 0,0
14	38,7	38,4 - 38,9	31,3	26,0 - 35,0	0,0	0,0 - 0,0
15	38,8	38,6 - 39,0	29,3	26,0 - 32,0	0,0	0,0 - 0,0
16	39,0	38,6 - 40,2	29,8	26,0 - 34,0	0,0	0,0 - 0,0
17	38,8	38,6 - 38,9	29,3	26,0 - 35,0	0,0	0,0 - 0,0
18	39,0	38,8 - 39,4	29,8	28,0 - 31,0	0,0	0,0 - 0,0
19	39,1	38,5 - 39,5	29,8	29,0 - 31,0	0,1	0,0 - 0,8
20	38,8	38,6 - 39,6	30,3	29,0 - 31,0	0,3	0,0 - 1,0
21	38,8	38,5 - 39,1	27,6	22,0 - 34,0	0,7	0,25 - 2,15
22	39,0	38,7 - 39,4	25,5	21,0 - 35,0	1,4	0,30 - 3,65
23	39,5	38,6 - 41,0	22,8	16,0 - 26,0	4,2	0,35 - 18,20
24	39,5	38,5 - 41,0	21,4	11,0 - 24,0	7,0	1,20 - 23,90
25	39,3	38,7 - 40,3	19,4	8,0 - 29,0	6,8	0,75 - 39,30
26	39,4	38,6 - 41,1	16,8	7,0 - 27,0	3,2	0,55 - 13,0
27	38,9	38,4 - 40,6	16,7	8,0 - 26,0	1,0	0,10 - 2,00
28	38,8	38,3 - 39,1	19,0	8,0 - 26,0	0,7	0,10 - 1,50
29	38,7	38,3 - 39,2	20,8	9,0 - 28,0	0,5	0,10 - 1,20
30	38,9	38,7 - 39,1	22,2	10,0 - 29,0	0,5	0,10 - 1,10
31	38,6	38,2 - 39,7	23,1	12,0 - 29,0	0,4	0,10 - 0,95
32	38,8	38,5 - 39,2	25,2	13,0 - 30,0	0,4	0,10 - 0,80
33	38,7	38,4 - 39,0	27,1	15,0 - 33,0	0,3	0,15 - 0,75
34	38,8	38,6 - 39,0	29,3	18,0 - 35,0	0,3	0,10 - 0,55
35	38,8	38,6 - 39,0	31,6	25,0 - 36,0	0,2	0,10 - 0,30

\* Valores médios de temperatura obtidos entre os dias 1 a 10 pós-inoculação.

Tabela 2. Resultados das comparações múltiplas das variáveis temperatura retal, volume globular e parasitemia observados em bovinos experimentalmente infectados com *Anaplasma marginale*.

Dia pós-inoculação	Parâmetro avaliado/ Média1=[ $\sum \log(x+1)/n$ ]		
	Temperatura retal (°C)	Volume globular (%)	Parasitemia (%)
10	1,5998 A	1,5142 A	0,000 F
11	1,6008 A	1,5137 A	0,000 F
12	1,5993 A	1,5137 A	0,000 F
13	1,5984 A	1,5049 A	0,000 F
14	1,5990 A	1,5070 A	0,000 F
15	1,5997 A	1,4804 AB	0,000 F
16	1,6020 A	1,4865 AB	0,000 F
17	1,5995 A	1,4800 AB	0,000 F
18	1,6019 A	1,4887 AB	0,000 F
19	1,6029 A	1,4889 AB	0,043 F
20	1,5999 A	1,4959 A	0,082 EF
21	1,6002 A	1,4531 ABC	0,193 CDE
22	1,6018 A	1,4193 BCD	0,329 BCD
23	1,6071 A	1,3708 CDEF	0,547 ABC
24	1,6070 A	1,3332 DEF	0,754 A
25	1,6055 A	1,2764 EF	0,675 AB
26	1,6067 A	1,2194 F	0,547 AB
27	1,6014 A	1,2155 F	0,286 BCD
28	1,5999 A	1,2754 EF	0,206 CDE
29	1,5986 A	1,3159 DEF	0,175 CDE
30	1,6008 A	1,3458 CDEF	0,159 CDE
31	1,5972 A	1,3665 CDEF	0,135 DE
32	1,5995 A	1,4029 BCDE	0,134 DEF
33	1,5990 A	1,4364 ABCD	0,124 EF
34	1,5999 A	1,4718 ABC	0,095 F
35	1,6000 A	1,5102 A	0,074 F

\* Valores médios de temperatura obtidos entre os dias 1 a 10 pós-inoculação.

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si ( $P>0,05$ ).

Tabela 3. Resumo das atividades registradas nos bovinos experimentalmente infectados com *Anaplasma marginale*.

Bovino	Animal esplenectomizado?	1ª Parasitemia: Data (Parasitemia/VG/ Temperatura)	1º Tratamento específico: Data (Parasitemia/VG/ Temperatura)	Nº de tratamentos (Datas pós-inoculação)	Estabilização do quadro clínico (Data pós-inoculação)
3510	Não	19 (0,80% - 31% - 39,0°C)	25 (3,45% - 16% - 40,1°C)	2 (25 e 26 DPI)	28
3571	Não	21 (0,95% - 30% - 38,8°C)	24 (3,20% - 26% - 39,3°C)	3 (24, 25 e 26 DPI)	28
3492	Não	21 (0,30% - 26% - 38,6°C)	24 (3,50% - 24% - 39,7°C)	1 (24 DPI)	27
3534	Sim	21 (0,25% - 21% - 38,9°C)	24 (2,90% - 20% - 39,3°C)	2 (24 e 25 DPI)	27
3487	Sim	20 (1,0% - 31% - 38,6°C)	23 (18,20% - 20% - 39,5°C)	4 (23, 24, 25 e 26 DPI)	30
3488	Sim	21 (1,25% - 31% - 38,8°C)	23 (5,25% - 27% - 39,5°C)	4 (23, 24, 25 e 26 DPI)	30

Tabela 4. Resultados da análise de correlação de Pearson para os parâmetros temperatura retal, microhematócrito e parasitemia.

-	Temperatura retal	Microhematócrito	Parasitemia
Temperatura retal	1,00000	-0,31289	0,66193
Valor de P	-	0,1196	0,0002
Microhematócrito	-0,31289	1,00000	-0,75717
Valor de P	0,1196	-	<0.0001
Parasitemia	0,66193	-0,75717	1,00000
Valor de P	0,0002	<0,0001	-

Tabela 5. Sinais clínicos observados entre os dias 23 e 26 pós-inoculação, em bovinos experimentalmente infectados com *Anaplasma marginale*.

Sinal clínico observado entre os dias 23 e 26 pós-inoculação	Número do bovino					
	3510	3492	3571	3534*	3487*	3488*
Mucosas pálidas	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Mucosas ictéricas	+	-	++	+	+	+
Diminuição no consumo de alimento	++	+	+	+++	+	+++
Apatia	++	-	+++	+++	+++	+++
Decúbito esternal	-	-	-	-	+++	+++
Diarréia	++	-	-	++	+++	++
Sialorréia	-	-	-	-	+	++

Sinal acentuado; sinal moderado; sinal discreto; ausência de sinal.

\* Animal esplenectomizado.

## CONCLUSÕES

Com base no modelo experimental utilizado nesse estudo, pode-se concluir-se que os bovinos necessitaram do primeiro tratamento específico contra *A. marginale*, cerca de 72 horas após a detecção direta do parasita em lâminas. Foram necessários de um a quatro tratamentos para haver a diminuição parasitológica e posterior recuperação clínica dos animais. Além disso, o período pré-patente e, conseqüentemente, o de incubação para esta enfermidade foi, em média, de 21 dias, entretanto, este período pode se estender um pouco mais de acordo com a quantidade de inóculo injetado ou também a via de administração utilizada para infectar os bovinos.

## COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo comitê de ética sob o processo PP 003E2/2012.

## REFERÊNCIAS

1. Moura AB, Vidotto O, Yamamura MH, Vidotto MC, Pereira AB. Studies of the *Anaplasma marginale* Theiler, 1910 infection in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) using “Nestede” PCR. Rev Bras de Parasitol Vet. 2003;12(3):27-32.

2. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dash GA, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of genera in the Families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in Order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51(4):2145-65.
3. Yu XJ, Zhang XF, McBride JW, Zhang Y, Walker H. Phylogenetic relationships of *Anaplasma marginale* and *Ehrlichia platys* to other *Ehrlichia* species determined by GroEL amino acid sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51(5):1143-6.
4. Scoles GA, Broce AB, Lysky TJ, Palmer GH. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). J Med Entomol. 2005;4(1):668-75.
5. Aguirre DH, Gaido AB, Vinadal AE, Echaide DST, Guglielmone AA. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different level rickettsaemia. Parasite. 1994;1:405-7.
6. Kessler RH. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. Pesqui Vet Bras. 2001;21(2):177-9.
7. Figueroa JV, Alvarez JA, Ramos JA, Rojas EE, Santiago C, Mosqueda JJ, et al. Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases. Ann N Y Acad Sci. 1998;849(1):1-10.
8. Coronado A. Is *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*? Rev Cient. 2001;11(3):408-11.
9. Guglielmone AA. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. Vet Parasitol. 1995;57(4):109-19.
10. Ribeiro MFB, Mila JD, Salcedo JHP. Attempted transmission of *Anaplasma marginale* by infected *Boophilus microplus*. Arq Bras Med Vet Zootec. 1996;48(4):397-402.
11. Cornell M, Hall WTK. Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. Aust Vet J. 1972;48(1):477.
12. Ribeiro MFB, Lima JD, Guimarães AM, Scatamburlo MA, Martins NE. Transmissão congênita da anaplasmoze bovina. Arq Bras Med Vet Zootec. 1995;47(6):297-304.
13. Stich RW, Kocan KM, Palmer GH, Ewing SA, Hair JÁ, Barronm SJ. Transtadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. Am J Vet Res. 1989;50(3):1377-80.
14. Shimada MK, Yamamura MH, Kawasaki PM, Tamekuni K, Igarashi M, Vidotto O, et al. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in larvae of *Boophilus microplus* ticks by polymerase chain reaction. Ann N Y Acad Sci. 2004;1026(2):95-102.
15. Jonsson MK, Reid SWJ. Global climate change and vector borne diseases. Vet J. 2000;160(2):87-9.
16. McCallon BR. Prevalence and economic aspects of anaplasmosis. In: Proceedings of 6th National Anaplasmosis Conference; 1973; Las Vegas. p.1-3.
17. Oliveira AA, Pedreira PAS, Almeida MFR. Doenças de bezerro. II epidemiologia da anaplasmoze no estado de Sergipe. Arq Bras Med Vet Zootec. 1992;44(5):377-86.

18. Santos HQ, Madruga CR, Linhares GFC. Estudo de prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia, pela reação de imunofluorescência indireta e Elisa. *Rev Bras Cienc Vet.* 2001;8(2):31-4.
19. Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura. Técnicas para el Diagnóstico de Babesiosis y Anaplasmosis Bovina. Costa Rica: IICA; 1984.
20. Portaria nº 48, de 12 de Maio de 1997. Dispõe sobre o regulamento técnico para licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário. Diário Oficial da União. 16 Maio 1997.
21. Coetzee JF, Apley MD, Kocan KM, Rurangirwa FR, Van Donkersgoed J. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. *Vet Parasitol.* 2005;127(5):61-73.
22. Massone F. Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas. 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
23. Terra RL. História, exame físico e registros clínicos dos ruminantes. In: Smith BP. Tratado de Medicina interna de grandes animais. Vol 1. São Paulo: Manole; 1993. p.3-15.
24. Feitosa FLF. Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico. 2a ed. São Paulo: Roca; 2008.
25. Palmer GH, Barbet AF, Cantor GH, McGuire TC. Immunization of cattle with the MSP-1 surface protein complex induces protection against a structurally variant *Anaplasma marginale* isolate. *Infect. Immun.* 1989;57(5):3666-9.
26. Gale KR, Leatch G, Vos AJ, Jorgensen WK. *Anaplasma marginale* effect of challenge of cattle with varying dosis of infected erythrocyte. *Int J Parasitol.* 1996;26(4):1417-20.
27. Lopes WDZ, Balieiro JCC, Santos RS, Untura RM. Comportamento do volume globular e da temperatura retal durante a fase de imunização de bovinos puros de origem importados. *Hora Vet.* 2004;141(6):49-51.
28. Jubb KVF, Fennedy PC, Palmer N. Pathology of domestic animals. Vol 3. 4th ed. New York: Academic Press; 1993.
29. Lima JD, Silva AC, Silva DSF. Eficácia do cloridrato de oxitetraciclina de longa ação no tratamento da anaplasmose em bovinos submetidos à premunicação. *Hora Vet.* 1999;108(4):37-42.
30. Rebhun W, Guard C, Richards CM. Doenças do gado leiteiro. São Paulo: Roca; 2000.
31. Kocan KM, Fuente J, Blouin E, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol.* 2010;167(2):95-107.
32. Magonigle RA, Newby TJ. Elimination of naturally acquired chronic *Anaplasma marginale* infections with a long-acting oxytetracycline injectable. *Am J Vet Res.* 1982;43(6):2170-2.
33. Roby TO, Simpson JE, Amerault TE. Elimination of the carrier state of bovine anaplasmosis with a long-acting oxytetracycline. *Am J Vet Res.* 1978;39(7):1115-6.
34. Kuttler KL. Influence of a second *Anaplasma* exposure on the success of the treatment to eliminate *Anaplasma* carrier infections in cattle. *Am J Vet Res.* 1983;44(1):882-3.
35. Swift BL, Thomas GM. Bovine anaplasmosis: elimination of the carrier state with injectable long-acting oxytetracycline. *J Am Vet Med Assoc.* 1983;183(3):63-5.

36. Rogers RJ, Dunster PJ. The elimination of *Anaplasma marginale* from carrier cattle by treatment with long acting oxytetracycline. Aust Vet J. 1984;61(3):306-8.
37. Ozlem MB, Karaer Z, Turgut K, Eren H, Irmak K, Inci A. Efficacy of long-acting oxytetracycline on bovine anaplasmosis. A U Vet Fak Derg. 1988;35(2):1-5.
38. World Organisation for Animal Health (OIE). Bovine anaplasmosis. In: Terrestrial animal health code. Paris: OIE; 2011. Chap 11.1.
39. Todorovic RA, Lopez AG, Conzalez EF. Bovine babesiosis and anaplasmosis: control by premonition and chemoprophylaxis. Exp Parasitol. 1975;37(3):92-104.
40. Carson CA, Sellis DM, Ristic M. Cell-mediated related to challenge exposure of cattle inoculated with virulent and attenuated strains of *Anaplasma marginale*. Am J Vet Res. 1977;38(2):1167-72.
41. Loos ACS, Lima JD, Braz JR, Assumpção TI. Avaliação da resposta humoral para anaplasmosse em bovinos submetidos à premunição. Arq Bras Med Vet Zootec. 1992;44(3):397-406.
42. Silva AC, Lima JD. Utilização de inoculo padronizado na premunição de bovinos contra anaplasmosse e babesiose. Rev Bras Parasitol Vet. 1995;4(1):212-4.
43. Facury-Filho EJ, Carvalho AU, Ferreira PM, Moura MF, Apolonário BC, Santos LP, et al. Effectiveness of enrofloxacin for the treatment of experimentally-induced bovine anaplasmosis. Rev Bras Parasitol Vet. 2012;21(2):32-6.
44. Ajayi SA, Wilson AJ, Campbell RSF. Experimental bovine anaplasmosis: clinico-pathological and nutritional studies. Res Vet Sci. 1978;25(2):76-81.
45. Blouin EF, De la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Sauer JR, Saliki JT, Kocan KM. Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. Anim Health Res Rev. 2002;3(2):57-68.
46. De la Fuente J, Golsteyn Thomas EJ, Van Den Bussche A, Hamilton RG, Tanaka EE, Druhan SE, et al. Characterization of *Anaplasma marginale* isolated from North American bison. Appl Environ Microbiol. 2003;69(2):5001-5.
47. Ferreira Neto JM, Viana ES, Magalhães LM. Patologia clínica veterinária. Belo Horizonte: Rabelo e Brasil; 1978.
48. Jones TC, Hunt RD, King NW. Patologia veterinária. 6a ed. São Paulo: Manole; 2000. p.76-9.
49. Fuentes IP, López MV, Pascual LC, Richman ER. Icterícia. In: Protocolo Diagnóstico e Terapêutica em Pediatria [Internet]. Madrid: Asociación Española da Pediatría; 2004 [cited 2008 Sept 25]. Available from: <http://www.aeped.es/protocolos/urgencias/15.pdf>.
50. Boero JJ. Parasitosis in animals: piroplasmosis. Tomo II. Buenos Aires: Editorial Uni; 1974.

**Recebido em: 08/04/2015**

**Aceito em: 16/05/2016**