

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
BACHARELADO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**DESCRIÇÃO DE UM SURTO DE ANAPLASMOSE EM GADO NELORE
ADULTO NO MUNICÍPIO DE ARINOS-MG EM 2018**

Lucas Teixeira da Silva

Unai
2018

**DESCRIÇÃO DE UM SURTO DE ANAPLASMOSE EM GADO NELORE
ADULTO NO MUNICÍPIO DE ARINOS-MG EM 2018**

Lucas Teixeira da Silva

Orientador:

Prof. Dr. Jenevaldo Barbosa da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Bacharelado de Ciências Agrárias, como
parte dos requisitos exigidos para a conclusão
do curso.

APROVADO em ... / ... / ...

Profa. Dra. Débora Ribeiro Orlando – ICA/UFVJM

Prof. Dr. Rafael Romero Nicolino – ICA/UFVJM

Prof. Dr. Jenevaldo Barbosa da Silva – ICA/UFVJM

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por mais uma etapa da minha vida e todos aqueles que foram colocados à minha volta para que esse momento fosse possível.

Aos meu país, José Valdir da Silva e Eune Teixeira da Costa Silva, por todo suporte e assistência que me proporcionaram e me proporcionam até hoje. Ao meu afilhado, Antônio Teixeira Albuquerque, que mesmo sem muita influência, me proporciona ser uma pessoa melhor a cada dia. A minha irmã, Bruna Teixeira da Silva, que, todos os dias, me ajuda de todas as formas possíveis.

Ao meu orientador, Jenevaldo Barbosa da Silva, pela orientação na elaboração desta monografia, nos projetos e ensinamentos que tive a oportunidade de assimilar em sua companhia.

Aos integrantes do Laboratório Multidisciplinar de Ciências Básicas I do Instituto de Ciências Agrárias-ICA/UFVJM, que me auxiliaram na coleta das amostras e posteriormente no processamento e leitura dos resultados.

Aos meus amigos, que de forma individual, me auxiliaram na realização desse estudo, de forma direta, com ideias e informações ou de forma indireta, ajudando a passar por momentos difíceis impostos pela vida.

A Fazenda Buritis II, que disponibilizou o material para estudo, nos auxiliou com a alimentação, transporte e coleta das amostras.

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP/UFRRJ) do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária (DESP/IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), por realizar o teste da Reação da Cadeia em Polimerase (PCR).

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) que tem proporcionado Bolsa de Iniciação Científica para desenvolvimento das atividades de pesquisa durante meus anos de graduação.

Gostaria de agradecer também ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Campus Unaí pelo constante apoio e fornecimento da infraestrutura necessária para realização do presente trabalho incluindo todos os profissionais multidisciplinares do ICA.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1	<i>Anaplasma marginale</i>	7
2.2	Ciclo Biológico <i>Anaplasma marginale</i>	7
2.3	Formas de Transmissão.....	8
2.4	Epidemiologia.....	9
2.5	Alterações clínicas.....	9
2.6	Alterações hematológicas	10
2.7	Alterações anatomopatológicas	11
2.8	Métodos de diagnósticos	11
2.9	Tratamento	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1	Conselho de Ética no Uso de Animais	13
3.2	População sob estudo.....	13
3.3	Processamento amostral.....	14
3.4	Esfregaço em camada delgada.....	14
3.5	Extração de DNA	14
3.6	PCR para <i>B. bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>A. marginale</i>	15
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5	CONCLUSÕES	22
	REFERÊNCIAS	23

RESUMO

Anaplasma marginale é o mais prevalente patógeno transmitido por carrapatos em bovinos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, responsável por alta morbidade e mortalidade em bovinos nas regiões temperadas, subtropicais e tropicais. *Anaplasma marginale* é uma Rickettsia intracelular obrigatório, podendo ser transmitidas biologicamente por carrapatos, mecanicamente por moscas hematófagas e sangue infectado em fômites, e, menos comumente, por via transplacentária. Foram analisados esfregaço sanguíneo de 200 animais da raça Nelore, com idade média de dois anos e criados a pasto com suplementação no cocho. Os animais apresentavam todas as vacinas (aftosa, brucelose, carbúnculo e raiva) em dia e vermifugações em dia. Durante a primeira visita á propriedade, algumas observações foram realizadas: (i) presença de dípteros hematófagos em alta população e baixa população de carrapatos; (ii) animais magros, mucosa hipocorada e ictérica; (iii) alguns animais estavam prostrados e as fezes em aspecto de síbalas. Assim, foi coletado sangue de 200 animais com sinais clínicos do lote afetado (total de 480 animais), dos quais 90% (180/200) mostraram-se positivos para *A. marginale* no esfregaço sanguíneo. Posteriormente, 10 amostras positivas no esfregaço sanguíneo foram submetidas a PCR para o gene *msp5* do *A. marginale*, onde 100% (10/10) apresentaram resultado positivo. Adicionalmente, 12 animais vieram a óbito no decorrer do surto. Após o diagnóstico parasitológico confirmatório, todos os animais foram medicados com drogas a base de tetraciclina ou oxitetraciclina. Adicionalmente, observou-se a necessidade de emprego da terapia de suporte a base de transfusão sanguínea nos animais clinicamente doentes. Os animais apresentaram recuperação clínica satisfatória, reduzindo a mortalidade e os animais voltaram a ganhar peso.

PALAVRAS-CHAVE: *Anaplasma marginale*, Nelore, Surto

SUPORTE FINANCEIRO: UFVJM, FAPEMIG

1 INTRODUÇÃO

Anaplasmosse bovina é uma infecção causada por bactérias da família Anaplasmataceae, onde *A. marginale* (THEILER, 1910) é a espécie mais patogênica e a *Anaplasma centrale* (THEILER, 1911) tem menor importância na medicina veterinária. *Anaplasma marginale* está extensamente distribuída em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo (PALMER, 1989). É o patógeno transmitido por carrapatos mais prevalente do mundo, presente nos seis continentes causando uma alta morbidade e mortalidade nos rebanhos bovinos (KOCAN et al., 2010). Grande parte do Brasil pode ser classificado como uma área de estabilidade endêmica para a ocorrência de anaplasmosse bovina, mas ainda possui locais que possuem características, que levam a ser instáveis. A prevalência varia de acordo com a localização, com baixos índices de 16,3% na zona semiárida do estado de Sergipe (OLIVEIRA et al., 1992) chegando a quase 100% no estado do Rio de Janeiro (SILVA et al., 2014). Uma pesquisa sorológica realizada no estado de São Paulo, mostrou que 98% dos bovinos foram positivos para *A. marginale* (ANDRADE et al., 2004).

Anaplasma marginale é um patógeno que também pode ser transmitido mecanicamente por moscas hematófagas ou fômites com sangue infectado e, menos comumente, de forma transplacentária, (DUMLER et al., 2001; KOCAN et al., 2010; AUBRY & GEALE, 2011). Pertence à ordem Rickettsiales, (DUMLER et al., 2001), trata-se de uma bactéria gram negativa, intracelular obrigatória, que parasita geralmente os eritrócitos. Essa rickettsia apresenta-se como corpúsculos intraeritrocitários, visualizados em microscopia óptica como pequenos pontos escuros, de localização periférica, variando entre 0,1µm a 0,8µm (FARIAS, 1995).

O carrapato, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, é o principal vetor biológico de transmissão da *A. marginale* (MARTINS & CORRÊA, 1995). Neste sentido, existem três condições que devem ser observadas no momento da implantação da pecuária bovina em uma dada região, para um controle racional da anaplasmosse: (i) áreas livres de doenças transmitidas por carrapato, onde os bovinos ficam susceptíveis as doenças; (ii) áreas de instabilidade enzoótica, onde o clima não é favorável ao desenvolvimento de carrapatos, mas, ocorre infestações temporárias em populações de risco; (iii) áreas de estabilidade enzoótica, onde os prejuízos causados pelo carrapato são maiores que pelos patógenos que os mesmos transmitem (ARTECHE, 1992).

Os sinais clínicos notados resumem-se em icterícia, dispneia, taquicardia, febre, fadiga, sialorreia, diarreia, micção frequente, anorexia, perda de peso, aborto (RISTIC, 1981; ALDERINK & DIETRICH, 1983; BABET, 1995), podendo levar o animal à morte em menos de 24 horas (FARIAS, 1995). Mas esses sinais clínicos não são específicos, sendo preciso o diagnóstico diferencial para outras parasitoses. O diagnóstico anatomopatológico realizado através da necropsia, permite observar as alterações presentes no animal, podendo essas alterações macroscópicas estar associadas a cepa envolvida e a susceptibilidade individual do animal. As alterações mais comumente observadas são: sangue menos viscoso e aquoso, mucosa e serosa ictéricas, hepatoesplenomegalia, distensão da vesícula biliar com bile grumosa, (FAO, 1993; FARIAS, 1995). Na fase aguda da infecção, quando está com alta carga parasitária, *Anaplasma* spp. é facilmente detectado nos eritrócitos dos bovinos, através da técnica de esfregaço sanguíneo delgado corados pelo corante Giemsa (FAO, 1993; FARIAS, 1995). Mas quando o animal se recupera da alta carga parasitária, tornando-se portadores, com baixa parasitemia, o diagnóstico diminui a sensibilidade. Então deve-se escolher técnicas de diagnóstico mais sensíveis e específicos, como por exemplo a reação da cadeia em polimerase (PCR).

Poucos casos foram relatados sobre surto de anaplasmose em gado nelore, sobretudo adulto. Assim, o presente estudo tem o objetivo de investigar as causas associadas ao surto, desde o manejo do dos animais até as formas de transmissão do *A. marginale*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Anaplasma marginale*

Segundo Farias et al., (1995), *A. marginale* se caracteriza em formas de corpúsculos intraeritrocitários, que são observados em microscopia óptica como pequenos pontos enegrecidos, na periferia do eritrócito, variando seu tamanho entre 0,1µm a 0,8µm. No microscópio, são observados no mesmo plano dos eritrócitos e quando são observadas próximos a rompe-los, parecem estar em vacúolo formadas em sua membrana. Geralmente é a forma mais fácil de diagnosticar, pois próximo a romper o eritrócito, alcançará seu maior tamanho.

2.2 Ciclo Biológico *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale é uma rickettsia que realiza multiplicação nas células do epitélio intestinal dos carrapatos, onde a infecção do mesmo pode ocorrer na forma interestadial, em qualquer estágio. O ciclo de desenvolvimento do *A. marginale* é complexo e coordenado com o ciclo de alimentação do carrapato (KOCAN, 1986; KOCAN et al., 1992a, b). A alimentação do carrapato por eritrócitos infectados é a principal fonte de infecção das suas células intestinais. Após o desenvolvimento inicial no intestino, outros tecidos são infectados, incluindo as glândulas salivares que é a principal fonte por onde *A. marginale* será transmitido ao gado durante o repasto sanguíneo do carrapato (GE et al., 1996; KOCAN, 1986; KOCAN et al., 2004a). O desenvolvimento nos tecidos do carrapato ocorre dentro de vacúolos ou colônias (KOCAN et al., 2004a). A primeira forma do *A. marginale* observada nessas colônias é a forma reticulada (vegetativa) que se divide por fissão binária, formando grandes vacúolos com centenas de organismos. A forma reticulada converte para conformação densa, na qual é a forma ativa de infecção e pode sobreviver fora do hospedeiro por tempo limitado.

Depois que o carrapato faz a inoculação do patógeno na corrente sanguínea do hospedeiro, os corpúsculos iniciais se aderem aos eritrócitos, esses corpúsculos iniciais maturam e rompem a membrana do eritrócito, causando a lise, então migram para outros eritrócitos para realizar a multiplicação. Após a infecção eritrocítica ser detectada, o número de eritrócitos parasitados aumenta de forma exponencial, até a morte do animal ou quando sistema imune do animal consegue controlar a infecção. O período de incubação da anaplasmoze varia de 21 a 45 dias (KESSLER & SCHENK, 1998).

2.3 Formas de Transmissão

A transmissão de *A. marginale* pode ocorrer mecanicamente por moscas hematófagas ou fômites infectados e biologicamente por carrapatos (DIKMANS, 1950; KOCAN, 1986; KOCAN et al., 2003, 2004a).

A transmissão mecânica por fômites ocorre através de equipamentos, contaminados com sangue infectado, usados diariamente no manejo do rebanho, neste caso as agulhas têm maior relevância na contaminação, pois essas são compartilhadas para administração de fármacos e vacinas. Tem sido relatado a transmissão mecânica por dípteros hematófagos do gênero *Tabanus* spp. e *Stomoxys* spp. (EWING, 1981; FOIL, 1989; POTGIETER, 1979).

Aproximadamente 20 espécies de carrapatos realizam a transmissão biológica do *A. marginale* (DIKMANS, 1950; EWING, 1981; KOCAN et al., 2004), sendo que o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tem maior importância no Brasil. A transmissão para o bovino, normalmente ocorre de estágio para estágio, sendo que os carrapatos machos, por serem mais móveis e viverem mais tempo sobre o animal, são considerados mais importantes na transmissão da anaplasmose (KESSLER et al., 1998).

2.4 Epidemiologia

A anaplasmose bovina ocorre em áreas de ambiente tropical e subtropical (PALMER., 1989) e a doença é uma das principais restrições da produção de gado em muitos países. No Brasil, a associação entre a população de *R. (B.) microplus* e dípteros hematófagos com a anaplasmose bovina estabelece duas situações epidemiológicas. A primeira é observada nas regiões onde possui uma instabilidade sazonal na população de vetores, devido às condições climáticas ou por estratégias inadequadas no controle de ectoparasita (ARAÚJO et al., 2003). Essas condições, leva o rebanho a um longo período sem contato com o agente e quando se infectam novamente com o *A. marginale*, apresentam sintomatologia clínica aguda, com altas taxa de mortalidade. Essas condições levam a um cenário epidemiológico de instabilidade enzoótica (RIBEIRO et al., 1984; OLIVEIRA et al., 1992). O segundo cenário epidemiológico ocorre em áreas endêmicas, onde a população de vetores está presente durante todo ano. Nessas regiões, o rebanho apresenta maior resistência à infecção, pois o sistema imune gerou resposta contra *A. marginale*, ao serem infectados nos primeiros meses de vida quando ainda estão protegidos pelos anticorpos colostrais, e passam a ser portadores (ARAÚJO et al., 2003). Não é esperado surtos e nem altas taxas de mortalidade nestas áreas (RIBEIRO & REIS, 1981; SOUZA et al., 2000). Esses animais se tornam persistentemente infectado, com baixa parasitemia, servindo de reservatório para o patógeno (ERIKS et al., 1989).

2.5 Alterações clínicas

A anaplasmose possui formas clínicas superaguda, aguda e crônica/persistente (RISTIC, 1981; MARTINS & CORRÊA, 1995), conforme a carga bacteriana infectante, estado imunológico do animal e capacidade patogênica da cepa envolvida. Durante a fase aguda há um indício de resposta autoimune, o que caracteriza a anemia (CARSON &

BUENING, 1979), um dos principais sintomas da doença. Os principais sinais clínicos observados são icterícia, dispneia, taquicardia, febre, fadiga, lacrimejamento, sialorreia, diarreia, micção frequente, anorexia, perda de peso, aborto, às vezes agressividade (RISTIC, 1981; ALDERINK & DIETRICH, 1983; BARBET, 1995), outro sinal que também pode ser característico são as fezes secas e em formato de sibalas.

Na anaplasnose, a anemia progressiva ocorre a destruição extra vascular dos eritrócitos no baço e na medula óssea. Inicialmente, a anemia é normocítica evoluindo para macrocítica, com hiperplasia de medula óssea, reticulocitose, aumento do volume celular médio (THRALL, 2004) e da fragilidade osmótica das hemácias (BAKER et al, 1960). Os eritrócitos parasitados são removidos em poucos dias, reduzindo em até 80% o número de hemácias. Os eritrócitos velhos são fagocitados e destruídos continuamente pelos macrófagos. Essa anemia leva o animal a quadros de hiperventilação, que pode estar associado com quadros de pneumonia, pois a hiperventilação aumenta o contato com partículas e microrganismos do ambiente. A icterícia hemolítica ou pré-hepáticas ocorre por uma destruição excessiva de eritrócitos, resultando num aumento do complexo bilirrubina-albumina no sangue, excedendo a capacidade excretora do fígado (FERREIRA NETO, et. al. 1978). A icterícia obstrutiva ou pós-hepáticas caracteriza-se por uma obstrução pós-hepática, impedindo o fluxo normal da bile (FERREIRA NETO, et. al., 1978). Retida em qualquer local nas vias biliares, grande parte dela é reabsorvida na corrente sanguínea. Parte desse fluído sofre desidratação sendo precipitado no tecido em forma de pigmento biliar. A ocorrência de febre é descrita como um sinal clínico frequente na anaplasnose, especialmente durante o período de aumento da parasitemia, embora não ocorra em todos os casos (LOSOS, 1986; RICHEY, 1993).

2.6 Alterações hematológicas

Os sinais clínicos da anaplasnose, evidentes em animais susceptíveis, não são patognomônicos, sendo necessário o diagnóstico diferencial de outras enfermidades. Mas como característica importante, destaca-se a anemia, que no pico da enfermidade, a queda do hematócrito é acentuada e mais de 75% das hemácias podem estar infectadas, com o quadro podendo persistir até duas semanas. (NASCIMENTO et al., 1981; KREIER et al., 1991).

Segundo Klaus & Jones, (1968), é observado o aumento de células do sistema imune, na tentativa de combater a infecção. As imunoglobulinas M (IgM) aparecem no

início da infecção e são anticorpos que auxiliam na neutralização e opsonização do eritrócito infectado, elas são responsáveis por 75% da atividade de fixação do sistema complemento. Já as imunoglobulinas G (IgG), aparecem posteriormente, permanecendo por vários meses, conferindo uma infecção crônica. Observa-se também um aumento nos níveis das imunoglobulinas E (IgE) que fazem frente uma resposta contra parasitos.

2.7 Alterações anatomopatológicas

Os diagnósticos anatomopatológicos são realizados através da necropsia de animais que vão a óbito, acometido pela infecção. As alterações macroscópicas habituais são sangue menos viscoso e inconsistente, mucosas ictéricas, hepatoesplenomegalia, rins aumentados e escuros, vesícula biliar distendida com bile consistente e grumosa. Hemorragias em petéquias são frequentemente observadas em superfícies serosas, especialmente sobre o coração e pericárdio. O coração pode ser encontrado pálido e flácido (COETZEE et al., 2005). O baço remove os eritrócitos infectados da circulação e conforme o número desses eritrócitos aumente, a esplenomegalia é mais evidente. A distensão da vesícula biliar, a evidenciação do padrão lobular a coloração acastanhada do fígado e dos rins podem ser indicativas de lesão ou sobrecarga da função hepática e renal.

2.8 Métodos de diagnósticos

O diagnóstico laboratorial é extremamente importante, pelas consequências que a anaplasnose causa na bovinocultura. Existem técnicas indiretas e diretas, onde a escolha da prova está relacionada com o material coletado e técnica empregada pelo laboratório, bem como a sensibilidade ou especificidade desejada.

Na fase aguda da doença, com alta carga parasitária, *A. marginale* é detectado nos eritrócitos, através de esfregaços sanguíneos delgados corados com Giemsa (FAO, 1993; FARIAS, 1995). Contudo, essa técnica só pode ser confiável se o quadro clínico estiver avançado (POTGIETER & STOLTSZ, 1994).

Knowles et al. (1996), desenvolveu o ELISA competitivo (cELISA), usado atualmente para o diagnóstico de anaplasnose bovina. O teste utiliza um anticorpo monoclonal (Mab) para reconhecer Proteína Principal de Superfície 5 (MSP5), mas em regiões endêmicas para *A. centrale*, *A. marginale* e *A. phagocytophilum*, o cELISA não

diferencia a qual bactéria o MSP5 pertence. (HOFMANN-LEHMANN et al., 2004; LIN et al., 2004; DE LA FUENTE et al., 2004a)

A PCR é uma técnica que amplifica a sequência específica de DNA, *in vitro*, com alta sensibilidade, desenvolvida para identificar pequenas quantidades de DNA de diferentes agentes em amostras. A técnica pode ser utilizada na detecção de hemoparasitas em bovinos nos diversos estádios de desenvolvimento (STICH et al., 1993)⁴. A PCR amplifica repetidamente uma sequência escolhida do DNA do genoma do organismo alvo, o que leva a um produto facilmente detectável. Por ter um preço elevado, a PCR só é utilizada para validar outras técnicas com baixa sensibilidade, para confirmação do diagnóstico laboratorial. Outros métodos de detecção baseados em DNA já foram desenvolvidos, mas não são usados frequentemente para diagnosticar animais positivos, são usados para realizar a filogenia da bactéria. O método de esfregaço sanguíneo em lâmina espessa e o teste sorológico baseados nas MSP's continuam sendo os mais práticos para testar um grande número de animais.

2.9 Tratamento

O tratamento contra *Anaplasma* spp. não é padronizado, pois o estado clínico do animal que irá determinar o tratamento adequado. O mais comum é a antibioticoterapia, que age contra o agente de forma direta, os fármacos mais usados são o dipropionato de imidocarb e as tetraciclinas. Se o animal estiver desidratado e com o hematócrito baixo, deve-se realizar o tratamento suporte, com a administração de soro endovenoso e transfusão sanguínea.

O dipropionato de imidocarb, um dos principais fármacos utilizados no tratamento da doença, tem sido utilizado por mais de 30 anos em vários territórios (KOCAN et al., 2010). Porém ele possui um entrave na comercialização de animais abatidos que foram tratados, por reter muito resíduos em sua carcaça por períodos prolongados. (EMEA, 2005). As tetraciclinas, clortetraciclina e oxitetraciclina, são aprovados para o uso contra anaplasmose aguda nos Estados Unidos (BAYLEY, 2005). ROBY & MAZZOLA (1972) relataram que duas injeções de dipropionato de imidocarb, administradas a 5 mg/kg com 14 dias de intervalo, eliminaram *A. marginale* de animais portadores. Estudos anteriores relataram sucesso no tratamento com oxitetraciclina, administrada intravenosa em 11-22mg/kg de 5-12 dias, em bovinos com infecções persistentes de *A. marginale* (MAGONIGLE & NEWBY, 1982; ROBY et al., 1978).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Conselho de Ética no Uso de Animais

O presente estudo encontra-se dentro do projeto “Detecção de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* e *Tripanosoma vivax* em bovinos da Região Noroeste de Minas Gerais, Brasil” foi submetido ao Conselho de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e encontra-se de acordo com os preceitos e normas do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONSEA), sendo assim aprovado sob o protocolo N° 060/2016.

3.2 População sob estudo

O relato do surto de anaplasmose foi realizado na propriedade, Fazenda Buriti II, (Latitude de 15°59’01,05’’ S e longitude de 46°00’00,99’’), localizada no município de Arinos, Noroeste de Minas Gerais, Brasil. O acesso à fazenda é feito pela cidade de Arinos – MG, seguindo 18 km pela MG 202 em direção à Urucuia – MG/ Riachinho – MG. O empreendimento situa-se num raio de 19 km de uma Unidade de Conservação de Proteção Integral denominada Estação Ecológica do Sagarana em Arinos MG.

A propriedade possui uma área de 6.296,9137 hectares, tem como principal atividade, o uso da área para cultivo de milho, feijão, soja e sorgo. Já bovinocultura extensiva de corte desenvolve-se juntamente com as outras atividades, sendo criado cerca de 1.300 cabeças de gado, sendo manejados em cria e recria. O rebanho é formado principalmente por fêmeas com predomínio da raça nelore, a área de pastagem é de aproximadamente 1.400 ha, basicamente coberta por *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*. Os bovinos de corte são tratados com reposição mineral, ao cocho durante todo o ano, utilizando sal proteinado. O controle de endoparasitose é realizado uma vez ao ano no rebanho adulto, e, em bezerros, de 6 em 6 meses. O controle de ectoparasitose contra carrapatos e mosca é feito duas vezes por ano. O manejo de áreas de pastoreio é feito por rotação de acordo com a altura das pastagens. Possuem calendário para vacinação contra Febre Aftosa e Brucelose. Os animais que ocasionalmente morrem durante o período que permanecem na Fazenda, são enterrados em valas.

Foram coletados amostras de sangue no total de 200 bovinos *Bostaurus indicus* no mês de Fevereiro de 2018. Foram selecionados animais de um lote de 480 novilhas que encontrava-se próximos a áreas alagadas, que apresentaram sinais clínicos condizentes com a enfermidade.

3.3 Processamento amostral

As 200 amostras foram obtidas através de venopunção da veia jugular externa e veia cocigeana, em tubos com Ethylenediamine Tetraacetic Acid (EDTA) e sem EDTA e, posteriormente as amostras foram encaminhadas para o Laboratório Multidisciplinar de Ciências Básicas I do Instituto de Ciências Agrárias - ICA/UFVJM. As amostras foram alíquotadas EM QUANTOS ML em tubos tipo *ependorf*. O sangue colhido em tubo com anticoagulante EDTA foi usado para dosagem do volume globular, confecção de esfregaço sanguíneo para posterior identificação de hemoparasitas e extração de DNA. Uma alíquota de 0,07 mL do sangue foi utilizada para confecção dos esfregaços sanguíneos e outra alíquota de 1,50 mL foi acondicionada em tubos tipo *ependorf* e mantida em freezer a -20 °C para posteriormente serem utilizadas na realização da PCR. Posteriormente essas amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária (DESP/IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde foram submetidas ao teste na Reação de Cadeia Polimerase (PCR)

3.4 Esfregaço em camada delgada

Foram utilizadas lâminas de vidro limpas e desengorduradas, onde foi colocada 7µl de sangue próximo de uma das extremidades da lâmina, com auxílio de outra lâmina e colocada adiante da gota em um ângulo de 45°, onde o sangue foi espalhado pela superfície de contato das duas lâminas. Em seguida a lâmina foi mergulhada em álcool metílico por 4 minutos, para fixação, posteriormente as lâminas foram coradas por 45 minutos com solução de GIEMSA e lavadas em água corrente para retirar o excesso de corante. Posteriormente as lâminas foram lidas no microscópio óptico pela objetiva de 100 vezes com óleo auxiliar de imersão.

3.5 Extração de DNA

A extração de DNA a partir de sangue total foi realizada utilizando o Kit comercial Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN®, Valencia, Califórnia, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Como controle da extração, tubos contendo água estéril ultrapura foram intercalados a cada 10 tubos contendo amostras de sangue. O DNA extraído foi quantificado, identificado e armazenado em alíquotas de 10 µl em freezer a -20 °C para a posterior realização da PCR e sequenciamento.

3.6 PCR para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*.

Para detecção dos protozoários *B. bigemina* e *B. bovis*, foi usado a reação padronizada por LINHARES et al. (2002) para caracterização a nível genérico. Os iniciadores selecionados foram desenhados para identificar o gene 18SrRNA de *B. bigemina* (GenBank nº X59604) e *B. bovis* (GenBank nº U06105).

As amostras de DNA obtidas para diagnóstico molecular de *A. marginale* foram analisadas por meio da técnica de PCR padronizada por TORIONI DE ECHAIDE et al. (1998) e otimizada por SINGH et al. (2012). Assim, para a detecção de *A. marginale* foi usado 1.0 µl (20 pmol) de cada oligonucleotídeo para o gene MSP5, Amar MSP-5 eF (5' GCA TAG CCT CCG CGT CTT TC 3') e Amar MSP5 eR (5' TCC TCG CCT TGG CCC TCA GA 3'). Os iniciadores selecionados foram desenhados para identificar o gene que codifica a Proteína Principal de Superfície 5 (MSP5), de acordo com a estirpe de *A. marginale* (GenBank nº M93392).

Para a sequência MSP1 foram utilizados os protocolos descritos por LEW et al. (2002). A primeira reação foi conduzida com um volume final de 25 µl de mistura, contendo 5 µl de DNA genômico, 12.5µl de PCR Master Mix (Qiagen, Madison, Estados Unidos), 6.5 µl de água ultrapura e 1.6µ M de concentração de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores. Na segunda reação, também foi utilizado um volume final de 25 µl de mistura, sendo 1µl de DNA genômico amplificado na primeira reação, 12.5 µl de PCR Master Mix (Qiagen, Madison, Estados Unidos), 10.5 µl de água ultrapura e 1.6µ M de concentração de cada oligonucleotídeo iniciador. As reações foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 1733F (5'-TGT GCT TAT GGC AGA CAT TTCC-3'), 3134R (5'-TCA CGG TCA AAA CCT TTG CTT ACC-3') e 2957R (5'-AAA CCT TGT AGC CCC AAC TTA TCC-3') (LEW et al., 2002). Na primeira reação foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 1733F e 3134R e, na segunda reação os

oligonucleotídeos iniciadores 1733F e 2957R. A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C durante 5 minutos, 40 ciclos a 94 °C 30 segundos, 1 minuto a 55 °C e 2 minutos a 72 °C, seguido de uma extensão final de 7 minutos a 72 °C. As mesmas condições da primeira reação foram mantidas para o segundo ciclo de amplificação, sendo exceção que a temperatura de anelamento foi alterada para 60 °C.

Os produtos das reações da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE, com padrão de massa molecular Ladder 100pb (Ludwig Biotec®). Posteriormente, foram corados com brometo de etídio (0,4µg/mL; Invitrogen®) e visualizados sob transiluminador UV. A eletroforese foi realizada a 100 V/350mA durante 55 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos). Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta (2020E) acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Eagle-Eye II- Stratagene®). OLHAR A DESCRIÇÃO DO PCR

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, os animais são submetidos ao um manejo semiextensivo de pastagem recém-formados, o que caracteriza uma pequena população de carrapatos, reduzindo o contato do rebanho com esses ectoparasitas e conseqüentemente os animais também não entram em contato com o *Anaplasma marginale*, o que caracteriza uma área de instabilidade enzoótica. Assim esses animais provavelmente atingem a idade adulta sem induzir a imunidade adquirida frente ao *A. marginale*. Esse ponto torna o presente rebanho susceptível a ocorrência de surto da doença caso alguma adversidade no sistema introduza o patógeno na propriedade, sendo esse rapidamente transmitido aos demais animais tanto de forma biológica, mas sobre tudo de forma mecânica, visto que essa última dissemina o patógeno mais rapidamente entre os animais vulneráveis.

Anaplasma marginale é endêmico e pode causar surtos de anaplasnose, levando a perdas econômicas à pecuária brasileira (VIDOTTO et al., 1998; KOCAN et al., 2010). No entanto ainda não existem estudos para conhecer a epidemiologia da doença na Região Noroeste de Minas Gerais, Brasil. Em áreas endêmicas, animais zebuínos são naturalmente resistentes a carrapatos e à anaplasnose, ou desenvolvem resistência ao

patógeno ainda jovens (JONSSON et al., 2008; JONGEJAN & UILENBERG, 2004). Os animais que se infectam nos primeiros dias de vida, em regiões onde o carrapato está presente durante todo ano, apresentam maior resistência devido à absorção de anticorpos colostrais, imunidade celular e presença de fatores séricos de resistência (MADRUGA et al., 1987a).

No dia 28/02/2018, foi realizada a primeira visita a Fazenda Buritis II, onde foram analisadas 200 novilhas oriundas de um lote de 480 novilhas da raça nelore. Os animais foram contidos individualmente em um brete, para a colheita de sangue e avaliação de sinais clínicos. Assim pode-se observar algumas características como alta presença de tabanídeos, baixa população de carrapatos e alguns animais com fraqueza e com mucosa pálida ou ictérica. Os animais foram observados a pasto e posteriormente foram levados ao curral para avaliação individual dos sinais clínicos de anaplasnose bovina. (Figura 1).

O diagnóstico de anaplasnose bovina pode ser feito inicialmente baseando-se na ocorrência da doença na região, sinais clínicos apresentados e achados de necropsia (JONES & BROCK, 1966). Porém, a confirmação do diagnóstico requer teste laboratoriais confirmatórios. Os resultados da leitura do esfregaço sanguíneo corados com Giemsa mostraram a presença de corpúsculos de inclusão de *A. marginale* nos eritrócitos. A associação dos sinais clínicos com a presença dos corpúsculos nos eritrócitos, permitiu fechar o diagnóstico de anaplasnose bovina nos animais, caracterizando o surto da doença. Durante a contenção individual dos animais foram observados baixa população de carrapatos e, em contrapartida, uma alta população de tabanídeos nos animais e no pasto, o que sugere a transmissão mecânica por díptero do *A. marginale*. Insetos hematófagos como (moscas, mosquitos, tabanídeos) e agulhas de injeção também contribuem para a transmissão da doença (GUGLIELMONE, 1994; SOLARI & QUINTANA, 1994; FARIAS, 1995).



Figura 1. Rebanho de gado nelore em fazenda da Região Noreoste de Minas Gerais. **A** e **B** – Rebenho de novilhas com idade média de 2 anos, mantidas em sistemas de manejo de pastagem semi-extensivo; **C** e **D** - Manejo no curral, do lote de novilhas para avaliar individualmente os sinais clínicos de anaplasmosse bovina.

No dia 02/03/2018, foi realizado uma segunda visita para medicar os animais que estavam com sinais clínicos de anaplasmosse. Foi realizado antibioticoterapia a base de Oxitetraciclina a 10 mg/Kg intravenoso ou 20 mg/Kg intramuscular profundo (Oxirat LA Plus®, Vallée, Montes Claros-MG) e transfusão sanguínea como tratamento suporte. As novilhas apresentavam um peso médio de 270 kg, assim estimou um volume de 2,0 litros para a transfusão. O hematócrito dos animais afetados foi estimado entre 14 – 18% e dos doadores entre 33 – 36%. Para doador, foi escolhido um animal aparentemente saudável do lote de vacas do rebanho. Para cada animal transfundido foi escolhido um doador diferente. Os animais com sinais clínicos graves de anaplasmosse foram contidos e posteriormente foi realizado o tratamento suporte e medicamentoso em brete (Figura 2).



Figura 2. Avaliação de um surto de anaplasmosose em bovinos de corte. **A e B** - Novilha com idade de 2 anos com sinais clínicos da doença; **C** - Novilha com sinal clínico de anaplasmosose recebendo antibioticoterapia e tratamento suporte; **D** - Animal defecando em forma de síbala; **E e F** - Icterícia sendo observada na conjuntiva ocular e mucosa vaginal hipocorada.

Visto que na segunda visita a propriedade, apenas os animais com clínica da doença foram tratados (75/480 animais). Como alguns animais poderiam estar em fase de incubação da doença, foi necessário realizar uma terceira visita, no dia 06/03/2018, com intuito de novamente avaliar os animais individualmente, passando um por um no brete de contenção, para determinar clinicamente aqueles que ainda necessitariam de tratamento medicamentoso e/ou terapia de suporte. Assim, os 480 animais foram avaliados clinicamente e, deste 240 necessitaram de tratamento. Os animais foram tratados com Oxitetraciclina LA, na dosagem única de 20 mg/Kg via intramuscular (Oxitrat LA Plus®, Vallée, Montes Claros-MG). Realização de antibioticoterapia, tratamento suporte e colheita de amostras para método de diagnóstico direto de anaplasmosose bovina durante a terceira visita a propriedade Buriti II (Figura 3).



Figura 3. Detecção e tratamento de bovinos de corte em um surto de anaplasmosse. **A** – Transfusão sanguínea para reposição hematológica em um bovino anêmico; **B** e **C** – Colheita de sangue da veia coccígea com tubo a vácuo contendo anticoagulante e EDTA; **D** – Tratamento dos animais clinicamente doentes com antibióticos a base de oxitetraciclina na dosagem de 20 mg/Kg em dose única; **E** – Confecção de esfregaço sanguíneo corado com Giemsa; **F** – Visualização de corpúsculo de inclusão de *Anaplasma marginale* em eritrócito de animal infectado.

Foi necessária uma quarta visita 29/09/2018 em virtude de o proprietário relatar alta população de carrapatos e os animais ainda apresentarem condições de escore corporal ruins. Assim, foram administrados carrapaticida (TexVet Max Pour on®, Bimeda, Monte Mor-SP), imunoestimulante (Ripercol® L Injetável, Zoetis, Campinas-SP) e antibiótico (Oxitrat LA Plus®, Injetável, Vallée, Montes Claros-MG). Assim, recomenda-se que os funcionários da propriedade observem os animais com sinais de apatia, pois esses podem apresentar anaplasmosse clínica, sendo necessária a presença do Médico Veterinário para instituir tratamento. Adicionalmente, recomenda-se ficar atento

para lotes formados por animais mais jovens e, sobretudo na presença de grandes infestações por carrapatos, moscas e mutucas, pois pode ocorrer novos surtos de anaplasmose. Realização de tratamento contra ectoparasitas, avaliação de mucosa e colheita de amostras para método de diagnóstico direto de anaplasmose bovina, durante a quarta visita a propriedade Buriti II (Figura 4).



Figura 4. Quarta visita a propriedade onde ocorreu o surto de anaplasmose. **A e B** – Medicamento acaricida pour on e injetável para controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; **C** – Colheita de sangue na veia coccígea para detecção de *Anaplasma marginale*; **D** – Observação de mucosa vaginal hipocorada.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo relata um surto de anaplasrose em bovinos adultos da raça nelore. O surto foi provocado em um primeiro momento pela infestação por tabanídeos e posteriormente por carrapatos. Animais mantidos sob baixa densidade de vetores, em função do manejo e da raça, podem desenvolver quadros graves de anaplasrose na fase adulta, quase sempre culminando com alta mortalidade.

Por ser tratar de um agente patogênico e de fácil transmissão mecânica, os rebanhos da região estão propensos a surto em qualquer época do ano. Como o surto ocorreu em bovinos nelores, com baixa população de carrapatos, realizar testes nas populações de moscas hematófagos pode ser uma alternativa para identificar os vetores do agente na região.

.

REFERÊNCIAS

- ALDERINK, F.J., DIETRICH, R.A. Economic and epidemiological implications of anaplasmosis in Texas beef cattle herds. **The Texas A&M University System**, B1426, p.1-16, 1983.
- ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.4, p.139-148, 2003.
- ARTECHE, C.C.P. Imunoprofilaxia da tristeza parasitária bovina (TPB) no Brasil. Uso de cepas atenuadas da *Babesia* spp e de cepa de *Anaplasma*. **A Hora Veterinária**, n.66, mar/abr, p.39-42, 1992.
- AUBRY P.; GAELE D.W. A review of bovine anaplasmosis. **Transboundary Emerg Dis**, 58(1): 1-30, 2011.
- BAKER, N.F.; OSEBOLD, J.W.; CHRISTENSEN, J.F. Erythrocyte survival in experimental anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**., p.590-596, 1961.
- BARBET, A.F. Recent developments in molecular biology of anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**., v.57, p.57, 43-49, 1995.
- BAYLEY, A. J. Compendium of veterinary products. 8º edição. **North American Compendiums INC.**, 2005.
- CARSON, C.A., BUENING, G.M. The immune response of cattle to live and inactivated *Anaplasma* vaccines and response challenge. **The South African Veterinary Association**., v.38, n.4, p.330-331, 1979.
- COETZEE, J.F., APLEY, M.D., KOCAN, K.M., RURANGIRWA, F.R., VAN DONKERSGOED, J. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. **Veterinary Parasitology**., v.127, 61–73, 2005.
- de la FUENTE, J., NARANJO, V., RUIZ-FONS, F., VICENTE, J., ESTRADA-PENÁ, A.N., ALMAZÁNI, C., KOCAN, K.M., MARTÍN, M.P., GORTAZÁR, C., 2004a. 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. **Eur. Journal of Wildlife Diseases**. 50, 187–196
- DIKMANS, G. The transmission of anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**., v.11, 5–16, 1950.

DUMLER J.S.; BARBET A.F.; BEKKER C.P.J.; DASCH G.A.; PALMER G.H.; RAY S.C, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the 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. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 51(6): 2145-2165, 2001.

EMEA, 2005. **Note for guidance on environmental risk assessment of medicinal products for human use**. CPMP/SWP/4447/00 draft corr., European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London.

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

FAO - Organização de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Consulta de Expertos: **Informe FAO**, 27 Out, 1993.

FARIAS, N.A. da R. Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina. **Agropecuária**, 80p, 1995.

FERREIRA NETO, J.M., VIANA, E.S., MAGALHÃES, L.M., **Patologia clínica veterinária**. Rabelo e Brasil, 1978, pp. 224-228.

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

HOFMANN-LEHMANN, R., MELI, M.L., DREHER, U.M., GOÑEZI, E., DEPLAZES, P., BRAUN, U., ENGELS, M., SCHUPBACH, J., JOÜRGER, K., THOMA, R., GRIOT, C., STA'RK, K., WILLI, B., SCHMIDT, J., KOCAN, K.M., LUTZ, H. Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. **Journal Clinical Microbiology**. 42, 3775–3780, 2004.

KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M. Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. **EMBRAPA – CNPGC**. p.157, 1998.

KLAUS, G.G.B., JONES, E.W. The immunoglobulin response in intact and splenectomized calves infected with Anaplasma marginale. **Journal Immunology**, v.100, n.5, p.991- 999, 1968.

KOCAN, K.M.. Development of Anaplasma marginale in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. In: Sauer, J.R., Hair, J.A. (Eds.), Morphology, Physiology and Behavioral Ecology of Ticks. **Ellis Horwood Ltd.**, pp. 472–505, 1986.

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** 129, S285–S300, 2004.

KOCAN, K.M., GOFF, W.L., STILLER, D., CLAYPOOL, P.L., EDWARDS, W., EWING, S.A., HAIR, J.A., BARRON, S.J. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible cattle. **J. Med. Entomol.** 29, 657–668, 1992a.

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.** 5, 499–507, 1992b.

KOCAN, K.M.; de la FUENTE, J.; BLOUIN, E.F.; COETZEE, J.F.; EWING, S.A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology.** 167, 95–107, 2010.

KREIER, J.P., GOTHE, R., IHLER, G.M., et al. The hemotrophic bacteria: The Families Bartonellaceae and Anaplasmataceae. In: BALOWS, A., TRUPER, H.G., DOWORKIN, M., et al. *The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* 2. ed. **Spring Verlag**, Cap.225, p.3994-4022, 1991.

LINHARES, G.F.C.; SANTANA, A.P.; LAUEMAN, L.H.; MADRUGA, C.R. Assessment of primers designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v.3, n.1, p.27-32, 2002

LOSOS, G.J. Rickettsial Diseases – Anaplasmosis. In: *Infectious tropical diseases of domestic animals.* **Churchill Livingstone Inc.**, p. 742-795, 938p. 1986.

MAGONIGLE, R.A.; NEWBY, T.J. Elimination of naturally acquired chronic *Anaplasma marginale* infections with a long-acting oxytetracycline injectable. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, n.1, p.2170–2172, 1982.

MARTINS, J.R., CORRÊA, B.L. Babesiose e anaplasmosose bovina: aspectos destas enfermidades. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.1, n.1, p.51-58, 1995.

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

NASCIMENTO, M.D. do, PINHEIRO, J.G., RIBEIRO, M.F.B. Alterações do quadro eritrocitário e sideremia de bezerros portadores de anaplasmosose. Niterói, RJ : **Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro**, p.1-2., 1981. (Comunicado Técnico PESAGRO-RIO, 97).

OLIVEIRA, A.A.; PEDREIRA, P.A.S.; ALMEIDA, M.F.R.S. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasmoze no estado de Sergipe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, n.5, p.377-386, 1992.

PALMER, G.H. Anaplasma vaccines. In: WRIGHT, I.G. Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines. **CR.**, Cap.1, p.1-29. 1989.

POTGIETER, F.T. Epizootiology and control of anaplasmosis in South Africa. **The South African Veterinary Association**. 504, 367–372, 1979.

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, pp. 408–430, 1994.

RIBEIRO, M.F.B.; PATARROYO, J.H.; SANTOS, J.L.; FARIAS, J.E. Epidemiologia da anaplasmoze bovina no estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.36, n.4, p.425-432, 1984.

RIBEIRO, M.F.B.; REIS, R. B. Exposição natural de bezerros, em áreas endêmicas de Anaplasma marginale, de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.33, n.1, p.63-66, 1981.

RICHEY, E.J. Bovine Anaplasmosis In: Howard - Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice. 3 rd Ed. Philadelphia:W.B. **Saunders Company.**, 1233p., p. 767-772, 1993.

RISTIC, M. Anaplasmosis. In: RISTIC, M., McINTYRE, I. Diseases of cattle in the tropics - economic and zoonotic relevance. **Current topics in veterinary medicine and animal Science**, V.6, p.327-344, 1981.

ROBY, T. O.; MAZZOLA, V. Elimination of the carrier state of bovine anaplasmosis with imidocarb. **American Journal of Veterinary Research**, v.33, n.10, p.1931–1933, 1972.

SILVA, J.B.; FONSECA, A.H.; BARBOSA, J.D.; CABEZAS-CRUZ, A.; DE LA FUENTE, J. Low genetic diversity associated with low prevalence of Anaplasma marginale in water buffaloes in Marajó Island, Brazil. **Ticks Tick Borne Diseases**. v.5, n.1, p.801–804, 2014.

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

THEILER, A. Anaplasma marginale (gen. and spec. nov.): A protozoon of cattle; a cause of the called gall-sickness. **The Transvaal Medical Journal**, v.5, n.1, p.110-111, 1910.

THRALL, A.M. Veterinary Hematology and Chemical Chemistry 1 st Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004, 518p., p.301- 328.