

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA**

**TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA DE *Anaplasma marginale* (THEILER,  
1910) EM BOVINOS DO SUL DO RIO GRANDE DO SUL**

**HERMANN EDUARDO GONZALEZ GRAU**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Dra. Nara Amélia da Rosa Farias, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Parasitologia, para a obtenção do título de Mestre em Ciência (M.Sc.).

**PELOTAS  
Rio Grande do Sul – Brasil  
Março de 2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**HERMANN EDUARDO GONZALEZ GRAU**

**TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA DE *Anaplasma marginale* (THEILER,  
1910) EM BOVINOS DO SUL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências (M.Sc.).**

**Orientador: Dra. Nara Amélia da Rosa Farias**

**PELOTAS  
Rio Grande do Sul – Brasil  
Março de 2006**

**Dados de catalogação na fonte:**

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

**G774t      Grau, Hermann Eduardo Gonzales**  
**Transmissão transplacentária de *Anaplasma***  
***marginale* (Theiler, 1910) em bovinos do Rio Grande do**  
**Sul / Hermann Eduardo Gonzáles Grau ; orientador Nara**  
**Amélia da Rosa Farias. – Pelotas, 2006. – 53f. ; il. color. –**  
**Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em**  
**Parasitologia. Departamento de Microbiologia e**  
**Parasitologia. Instituto de Biologia. Universidade Federal**  
**de Pelotas. Pelotas, 2006.**

**1.*Anaplasma marginale*. 2.Anaplasnose.**  
**3.Transmissão transplacentária. 4.Epidemiologia.**  
**5.Diagnóstico. I.Farias, Nara Amélia da Rosa. II.Título.**

CDD:

636.20896

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, aos meus pais, cuja lembrança ainda me guia.

Em seguida, ao velho e querido Rio Grande, que gentilmente me ofereceu todas as possibilidades que nunca tive em outro lugar.

Ao Sr. Tito Fernández por me recomendar às pessoas que garantiram por mim em Pelotas.

Ao Engenheiro Agrônomo Daniel Fernández e Sra. Esposa por me encaminhar na minha chegada a Pelotas e confiar na minha pessoa.

À Dra. Nara Amélia da Rosa Farias por sua orientação, amizade e principalmente por acreditar em mim ainda sem me conhecer, me recebendo como um amigo até na sua família.

Aos Professores Maria Elisabeth Berne, João Guilherme Brum, Paulo Bretanha Ribeiro, Gertrud Muller, Afonso Sinkoc, Claudiomar Brod, Althen Teixeira Filho, Élvia Elena Vianna e José Nascimento pela dedicação, competência, seriedade e justiça no proceder.

Ao Dr. Cláudio Madruga por me ajudar e facilitar o uso dos laboratórios da EMBRAPA / CNPGC – Campo Grande.

Aos pesquisadores. Flávio Araújo e Luciano Pinto por sua ajuda com o PCR.

Aos companheiros Jerônimo Ruas, Nilton (Nascimento) Cunha Filho, Tiago Corrêa e Felipe Pappen por sua amizade, e inestimável ajuda no campo e no laboratório, sempre com atitudes de camaradagem e respeito, típicas dos bons filhos do Rio Grande.

Ao Dr. Ary Pappen por ceder o seu rodeio bovino e as instalações do seu estabelecimento de criação no Município do Capão do Leão, e ao Sr. Beloni Lobato

por sua ajuda permanente até nas horas mais impróprias, sempre com boa vontade e melhor gênio.

À Estação Agroclimatológica de Pelotas ( EMBRAPA/ETB ) pelos dados climatológicos fornecidos.

A todos os colegas do Mestrado que foram sempre muito amigos e que de uma forma ou outra contribuíram no meu trabalho, me influenciando sempre positivamente e fundamentalmente com alegria e esperança.

A todos, muito obrigado.

## RESUMO

GRAU, Hermann Eduardo. **Transmissão transplacentária de *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910) em bovinos do sul do Rio Grande do Sul.** 2006. 53f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas.

Foi estudada a transmissão transplacentária do *Anaplasma marginale* em terneiros ao nascimento, produtos de vacas cronicamente infectadas, sem histórico de anaplasmosose aguda durante a gestação. O estudo foi realizado em 30 terneiros e suas matrizes, no Município de Capão do Leão, região sul do Rio Grande do Sul, área de instabilidade enzoótica para *A. marginale*, onde as condições climáticas são desfavoráveis ao desenvolvimento dos vetores durante o período de inverno, quando as temperaturas médias são inferiores a 15°C. Foram colhidas amostras de sangue dos terneiros antes da ingestão do colostro, aos 3 a 5 dias de vida, e das matrizes logo após o parto. Os testes sorológicos usados foram Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoadsorção Enzimática Indireto (ELISA I), e o exame direto foi através de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Em 63,3% das matrizes, foi diagnosticada a infecção por *A. marginale* no PCR, enquanto que 100% das mesmas foram sorologicamente positivas na RIFI e 97% no ELISA. A transmissão transplacentária do agente foi constatada através da presença de anticorpos (IgG) em 10 % dos terneiros nascidos de mães positivas, e do DNA do agente em 10,5 % dos mesmos. Foi constatada uma concordância de 93,3% entre os resultados das técnicas sorológicas usadas, sendo que a precisão em relação ao PCR, foi de 80% para RIFI e de 76,7% para ELISA. São discutidos os resultados dos testes e a importância epidemiológica da transmissão transplacentária do *A. marginale*.

Palavras-chave: *Anaplasma marginale*. Transmissão transplacentária. Epidemiologia. Diagnóstico.

## ABSTRACT

GRAU, Hermann Eduardo. **Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910) in bovines from the southern of Rio Grande do Sul.**, 2006. 53p. Dissertation (Parasitology Master) – Institute of Biology, Microbiology and Parasitology Department, Federal University of Pelotas.

The transplacental transmission of *Anaplasma marginale* was studied in calves at the birth, from mothers chronically infected, without medical history of acute anaplasmosis during the pregnancy. The study was carried out using 30 calves and their mothers, from Capão do Leão county, in the southern region of Rio Grande do Sul state, Brazil, which represents an area of enzootic instability to *A. marginale* infection, where during the winter season, the climatic conditions are hostile to the development of the vectors. The blood samples of the calves were collected before the colostrum ingest, from 3 to 5 days of live, and the mothers were also collected. The serological tests used were Indirect Fluorescent Antibody Technique (IFAT) and Indirect ELISA; the direct examination was carried out by Polymerase Chain Reaction (PCR). The results presented in the mothers were 63,3% in the direct examination by PCR test and in the indirect serological tests, IFAT and Indirect ELISA the percentage of positive, were respectively, 100% and 97%, to the infection by *A. marginale*. The transplacental transmission of the agent was determined by the presence of antibodies (IgG) in 10% of the calves born of positive mothers, and by the agent DNA in 10,5% of them. An agreement of 93,3% was observed between the results of the serological techniques used, the precision in relation to the PCR test was 80% to IFAT and 76,7% to Indirect ELISA. The results of the tests and epidemiological importance of the transplacental transmission of the *A. marginale*, are discussed.

Key-words: *Anaplasma marginale*. Transplacental transmission. Epidemiology. Diagnostic.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig 1.	Eritrócitos bovinos infectados por <i>Anaplasma marginale</i> , em distensão delgada corada por Giemsa (1000x).....	14
Fig 2.	Representação esquemática da Reação de Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos contra <i>Anaplasma marginale</i> (adaptado de MADRUGA et al, 2001).....	22
Fig 3	Representação esquemática de um ELISA Indireto para pesquisa de anticorpos contra <i>Anaplasma marginale</i> (MADRUGA et al, 2001).....	23
Fig 4.	Animais experimentais da Estância Bela Vista, Capão do Leão, RS. Foto obtida logo após a coleta de sangue, anterior à ingestão de colostro.....	25
Fig 5.	Fluxograma representativo do delineamento experimental.....	27
Fig 6.	Condições climáticas da região experimental durante o ano 2004, período em que ocorreu a gestação e o parto dos animais em estudo, em comparação com as médias dos últimos trinta anos (normal).....	33
Fig 7.	Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) para diagnóstico de <i>Anaplasma marginale</i> em amostras de DNA do sangue dos terneiros ao nascer, antes da ingestão do colostro. 1- Marcador de pb 1 Kb Plus “ladder” (Invitrogen®); 2- Controle negativo; 3- Controle positivo; 5 e 16- Amostras positivas (terneiros nº2 e 13).....	34
Fig 8.	Porcentagens de matrizes e terneiros ao nascer com presença de DNA de <i>Anaplasma marginale</i> diagnosticado por PCR.....	35
Fig 9.	Porcentagens de matrizes, terneiros ao nascer e terneiros aos três dias do nascimento, soropositivos para <i>Anaplasma marginale</i> , diagnosticados por RIFI.....	37
Fig 10.	Porcentagens de soropositivos nas matrizes e terneiros ao nascer, diagnosticados por ELISA Indireto.....	39
Fig 11.	Freqüência de transmissão transplacentária de <i>Anaplasma marginale</i> detectada através de prova direta (PCR) e de prova indireta (RIFI), em bovinos cronicamente infectados.....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição dos resultados das técnicas de RIFI e ELISA Indireto para <i>Anaplasma marginale</i> em soro de 30 matrizes e 30 terneiros ao nascer.....	41
Tabela 2.	Resultados da análise de validade dos testes de RIFI para <i>A. marginale</i> de 30 vacas e 30 terneiros ao nascer, em relação à PCR (padrão ouro).....	42
Tabela 3.	Resultados e análise de validade dos testes de ELISA Indireto para <i>A. marginale</i> de 30 vacas e 30 terneiros ao nascer, em relação ao PCR (padrão ouro).....	43

## SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1. O agente <i>Anaplasma marginale</i> .....	14
2.2. Formas de transmissão.....	16
2.2.1. A transmissão transplacentária.....	17
2.3. Diagnóstico de anaplasmosose.....	20
2.3.1. Exame direto: determinação do agente por PCR.....	21
2.3.1.1. Extração de DNA.....	21
2.3.1.2. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR.....	21
2.3.1.3. Análise do produto de PCR em gel agarose.....	21
2.3.2. Exame indireto: Imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos para <i>Anaplasma marginale</i> .....	22
2.3.3. Exame indireto: ELISA indireto para detecção de anticorpos para <i>Anaplasma marginale</i> .....	24
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1. Locais de execução do experimento.....	24
3.2. Delineamento experimental.....	24
3.2.1. Animais experimentais.....	25
3.2.2. Obtenção de amostras de sangue.....	26
3.3. Execução das técnicas laboratoriais.....	27
3.3.1. Detecção do DNA de <i>Anaplasma marginale</i> por PCR.....	27
3.3.1.1. Extração do DNA (Kit Easy DNA).....	27
3.3.1.2. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR para <i>msh5</i> de <i>Anaplasma marginale</i> .....	28
3.3.1.3. Análise do produto de PCR em gel agarose.....	29

3.3.2. Determinação de IgG específicas para <i>Anaplasma marginale</i> por Imunofluorescência Indireta.....	30
3.3.3. Determinação de IgG específicas contra <i>Anaplasma marginale</i> por ELISA indireto.....	30
3.4. Indicadores epidemiológicos e análise estatística.....	31
3.5. Dados climáticos.....	31
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
4.1. Dados climáticos.....	32
4.2. Diagnóstico de <i>Anaplasma marginale</i> .....	32
4.3. Comparação entre as Técnicas de RIFI e ELISA Indireto.....	41
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Na África do Sul, Theiler (1910), estudando eritrócitos de bovinos com anemia aguda, descreveu um pequeno agente, diferenciando-o do agente causador da febre do Texas. A partir das características tintoriais, a ausência de citoplasma e a localização no eritrócito, propôs o nome de *A. marginale*.

Trata-se de um organismo sem retículo endoplasmático e membrana nuclear, e é Gram-negativo (AMERAULT et al., 1973). Ristic & Keier (1984) o classificam dentro da Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae.

Nos vertebrados, se comporta como intraeritrocitário obrigatório (KOCAN et al., 2000), infectando ruminantes domésticos e silvestres (KUTTLER, 1984), nos quais causa anemia progressiva e icterícia (RISTIC, 1960), cursando com fraqueza e anorexia (REHBUN, 2000).

A destruição eritrocitária ocorre por mecanismos que envolvem a participação de anticorpos, com a remoção dos eritrócitos opsonizados pelo sistema monocítico fagocitário no baço (GAUNT, 2000).

A anaplasnose, isoladamente ou em conjunto com a babesiose, com a qual forma o complexo “Tristeza Parasitária Bovina”, é responsável por perdas econômicas muito importantes na pecuária mundial, afetando a performance esperada dos animais, e limitando a produção. As principais perdas são: morte, redução do peso corporal, atraso no crescimento, duração do ciclo estral, abortos e baixa fertilidade em touros (SWIFT et al., 1983; RIBEIRO & LIMA, 1995). Também ocasiona importantes gastos com a mão de obra e com os tratamentos e manejos especiais (SACCO, 2001).

Na maioria das regiões do Brasil, a situação da anaplasnose bovina é de estabilidade enzoótica (RIBEIRO & REIS, 1981). No sul do Rio Grande do Sul a situação é considerada de instabilidade enzoótica, uma vez que levantamentos

realizados revelam índices de soropositividade dos bovinos entre 60% e 70% (ARTILES et al., 1995).

As formas de transmissão de *A. marginale* ocasionam polêmica quanto à importância de cada uma delas. Ainda que o agente seja conhecido há quase um século, persistem dúvidas com relação aos meios e mecanismos de transmissão e à importância epidemiológica dos possíveis vetores (KESSLER et al., 2001)

O diagnóstico laboratorial é feito através de testes diretos e indiretos. O exame direto para a detecção do DNA de *A. marginale* é feito pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com possibilidade de detecção de parasitemias tão baixas como 0,000025 % em portadores assintomáticos (STILLER, 1992).

Para o diagnóstico indireto, usam-se técnicas sorológicas para pesquisa de anticorpos contra *A. marginale*. O teste de ELISA Indireto é um ensaio amplamente utilizado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos em amostras de soro, com destaque em estudos soropidemiológicos (SOARES, 2001), e com sensibilidade ao redor de 96,9 % (MADRUGA et al., 2000). A Imunofluorescência Indireta (RIFI), ainda é uma das provas sorológicas mais empregadas (MADRUGA et al., 2000), com sensibilidade em torno de 97,2 %. Ambos os testes indiretos tem semelhantes custos por análise e sensibilidade, apresentando o ELISA Indireto mais objetividade nos resultados (SOARES, 2001).

Neste experimento, o objetivo geral foi determinar a importância das matrizes cronicamente infectadas na epidemiologia da anaplasmose, em área marginal para *Boophilus microplus*. Os objetivos específicos foram:

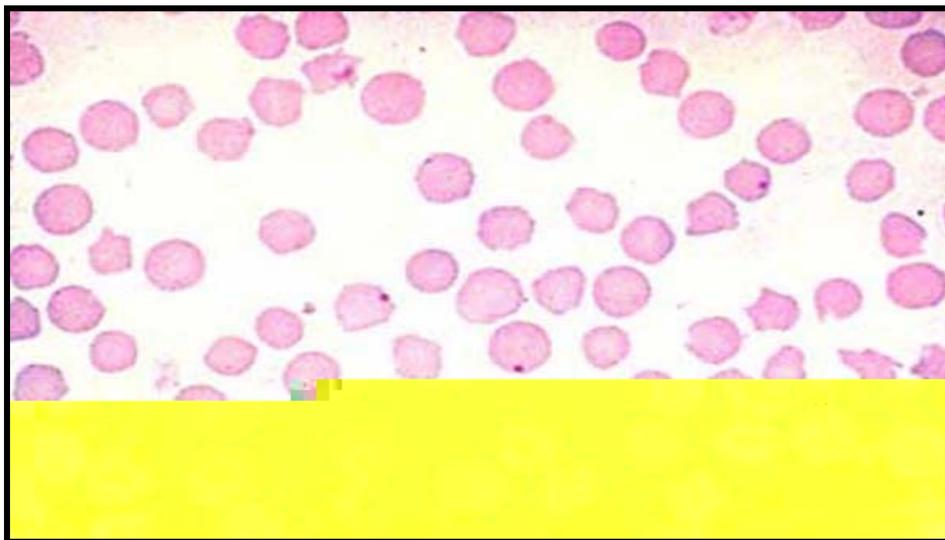
- Verificar a ocorrência da transmissão transplacentária de *A. marginale* em bovinos de corte cronicamente infectados, através de técnicas de diagnóstico direto e indireto;
- Avaliar a capacidade de matrizes cronicamente infectadas transferirem via colostro, anticorpos para *A. marginale* às crias;
- Verificar a especificidade e sensibilidade das técnicas de RIFI e ELISA no diagnóstico de anaplasmose crônica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O agente - *Anaplasma marginale*

São rickettsias Gram negativas, de pequeno tamanho, às vezes polimorfas. Apresentam-se de forma cocóide ou elipsoidal, imóveis, presentes nos vacúolos intracitoplasmáticos de maneira isolada ou reagrupada em inclusões densas ou mórulas. A estrutura de *A. marginale* é de bactérias Gram-negativas, mas sua parede é desprovida de peptidoglicano ou possui um peptidoglicano pouco rígido. Esta característica explicaria a sua fragilidade fora das células.

Atualmente é classificado como uma rickettsia intraeritrocitária obrigatória (KOCAN et al., 2000) (Figura 1).



Os estudos de microscopia eletrônica revelaram que o corpo de *A. marginale* é rodeado de membranas e que pode estar formado por um ou mais corpúsculos iniciais ou subunidades (RISTIC & WATRACH, 1961; SIMPSON et al., 1967).

O mecanismo de invasão no eritrócito por *Anaplasma* sp. foi estudado por vários autores. Ristic & Watrach (1963) sugeriram que a passagem dos corpúsculos iniciais de um a outro eritrócito ocorreria por meio de estruturas similares a microfibrilas que freqüentemente atravessam o eritrócito e, pela facilitação da penetração na membrana, por ação de enzimas. Estudos de microscopia eletrônica em sangue bovino infectado por *A. marginale*, eritrócitos caninos infectados por *Babesia canis* e eritrócitos felinos infectados por *Haemobartonella felis*, sugerem que o processo de invasão envolve um tipo de fagocitose, designado rfoecitose (SIMPSON et al., 1967).

A saída de *A. marginale* das células vermelhas infectadas, possivelmente ocorra de forma inversa à pinocitose, sem lesar a membrana celular do eritrócito, ou pela lise de eritrócitos frágeis devido a uma alta parasitemia (SIMPSON et al., 1967). Entretanto, ainda restam dúvidas sobre o ciclo intra-eritrocitário e sobre os mecanismos de invasão e êxodo do parasito *in-vivo*.

O processo de divisão de *A. marginale* ocorre por fissão múltipla da unidade infectante (RISTIC & WATRACH, 1963) com a invaginação da membrana do parasito. Há relatos de projeções semelhantes a dedos ou pontas na riquétsia, cuja função pode ser a alimentação (AMERULT et al., 1975; GATES et al., 1967) e o armazenamento de material enzimático que atua na desintegração das membranas, eritrocitária e vacuolar, e na alteração da densidade do citoplasma do eritrócito (MOULTON & CHRISTENSEN, 1953).

Segundo Giardina et al. (1983) no processo de invasão, divisão e posterior escape das recém formadas subunidades de *A. marginale* de eritrócitos infectados, estão envolvidos os seguintes passos:

1º - estágio de invasão - a membrana do eritrócito invagina e engloba o parasito com uma estrutura vesicular.

2º - estágio de divisão - o parasito se divide por fissão binária ou múltipla em novas unidades infectantes.

3º - estágio de saída - alterações na membrana e na densidade citoplasmática da célula hospedeira, causadas pela presença do parasito, induzem à formação de

poros na membrana através dos quais os parasitos saem para infectar outras células sanguíneas.

## 2.2 Formas de transmissão

As formas de transmissão de *A. marginale* são muito discutidas quanto à importância epidemiológica de cada uma. Ainda que esta rickettsia seja conhecida há quase um século, persistem dúvidas com relação aos seus meios e mecanismos de transmissão e a importância dos possíveis vetores.

A passagem biológica do agente por várias espécies de ixodídeos tem sido demonstrada experimentalmente (STILLER & COAN, 1995). Guglielmone & Mangold (no prelo) observaram a transferência de *B. microplus* entre bovinos em condições de campo e concluíram que a passagem do carrapato de um bovino a outro é baixa. Esse fato reduziria a importância desse carrapato monoxeno como vetor, uma vez que não ocorre transmissão transovariana de *A. marginale*. No entanto, recomendam a realização de maiores estudos para determinar a importância de *B. microplus* na epizootia de *A. marginale*. Segundo os autores, embora o papel de *B. microplus* na transmissão da anaplasmoze ainda não seja claro, é evidente a existência de outros meios tão ou mais importantes, uma vez que a doença existe mais ao sul da América do Sul, abaixo do paralelo 34° S, onde este carrapato não está presente.

A transmissão por insetos hematófagos ocorre de forma mecânica, através da inoculação de hemácias infectadas a um animal suscetível. A transferência deve ocorrer em poucos minutos enquanto o sangue permanece fresco no aparelho bucal do díptero (RISTIC, 1968).

Dípteros do gênero *Tabanus* são capazes de transmitir *A. marginale* até duas horas após ter picado um animal infectado, sugerindo a possibilidade de que a infecção possa se disseminar a distâncias maiores do que as consideradas normalmente (HAWKINS et al., 1982). *Stomoxys* sp. e *Haematobia irritans* também são possíveis transmissores, por serem insetos hematófagos (HOWAL, 1957).

A transmissão iatrogênica já foi constatada por Rees (1930). Esta forma é mecânica e ocorre durante a realização de tarefas onde são utilizados instrumentos com os quais podem ser levadas hemácias parasitadas de um animal infectado a

outro suscetível. As atividades mais comuns são a descorna (STILES, 1936, 1940), castração, cirurgias de identificação coletiva, contenção de animais com ferramentas que possam ferir como torquês tipo “formigas” (STILES, 1940) e por agulhas (KESSLER, 2001).

A transmissão transplacentária tem sido diagnosticada, sobretudo quando a matriz sofreu a forma aguda da doença durante a prenhez (DYKSTRA et al., 1948; HUBBERT, 1975; FOWLER & SWIFT, 1975; SWIFT & PAUMER, 1976; PASSOS & LIMA, 1984; ZAUGG & KUTTLER, 1984; ZAUGG, 1985). Entretanto, os casos reportados por Uilenberg (1968); Wandera & Munyua (1971); Bird (1973); Paine & Miller (1977); Norton et al. (1983); Potgieter & Van Rensburg (1987); Salaberria & Pino (1988) e Ribeiro et al. (1995), sugerem que essa forma de transmissão pode ocorrer em matrizes portadoras crônicas.

### **2.2.1 A transmissão transplacentária**

A importância da transmissão transplacentária, na epidemiologia da anaplasiose não é conhecida, sendo provável que seja significativa (POTGIETER & VAN RENSBURG, 1987).

Dykstra et al. (1948), verificaram em um lote de 17 vacas infectadas, a ocorrência dessa infecção em um terneiro (prevalência de 5,9 %). O terneiro foi produto de uma matriz infectada no último terço da gestação.

Uilenberg (1968), em Madagascar, cita um caso de transmissão congênita de *Anaplasma centrale* em um terneiro filho de uma matriz esplenectomizada portadora crônica do parasito.

Wandera & Munyua (1971) e Bird (1973), reportaram casos de anaplasiose clínica em terneiros neonatos. O longo período de incubação do agente (15 a 45 dias) sugere que esses animais foram infectados *in utero*. Nesses relatos, os terneiros morreram em consequência da anaplasiose embora as matrizes não tenham desenvolvido sinais clínicos da doença durante a gestação.

Hubbert (1975), estudando infecções parasitárias perinatais, relata infecções fetais bovinas por *A. marginale* e *A. centrale*. Segundo o autor, a transmissão vertical é mais provável quando a matriz sofreu processo agudo durante a gestação. Sugere que as diferentes amostras de *Anaplasma* sp. tenham afinidade variável pelo feto.

Fowler & Swift (1975), inocularam vacas de corte no último terço da gestação, negativas para *A. marginale* pelo teste de Fixação de Complemento, com sangue de bovinos portadores. Os autores observaram a ocorrência de abortos, morte fetal e o nascimento de um terneiro saudável portador do agente, comprovando assim a transmissão transplacentária. Os mesmos sugerem que a transmissão do *A. marginale* ocorre durante a fase extra-eritrocitária do agente, infectando ativamente o feto, já que as hemácias não passam pela placenta. Num processo agudo, com alta parasitemia, aumenta a probabilidade desta fase extra-eritrocitária atingir o feto, pois na fase crônica, a infecção persiste com baixa parasitemia, variando de 0,000025 a 0,0025 % (ERIKES et al., 1989).

Swift & Paumer (1976), inocularam sangue de bovino portador de *A. marginale* em vacas soronegativas, no último terço da gestação, induzindo a fase clínica da anaplasnose. Os autores comprovaram a transmissão transplacentária em dois de cinco animais subinoculados (40 %), sugerindo que a passagem do agente pela placenta ocorra cerca de 15 dias pós-inoculação endovenosa.

Paine & Miller (1977), detectaram *A. marginale* em esfregaço de amostra de sangue de um terneiro nativo do sul da África com 3 a 4 dias de idade, provindo de um rebanho de criação extensiva, o qual tinha sinais de fraqueza e icterícia. O animal apresentou 7 a 8 % de eritrócitos infectados e morreu aos seis dias de idade, não respondendo ao tratamento com Oxytetraciclina e à terapia de suporte.

Norton et al. (1983), na Austrália, constataram um caso (16,6 %) de transmissão transplacentária de *A. marginale* em terneiro nascido de matriz imunizada, originária de área endêmica para *B. microplus* que foi introduzida durante a gestação, em área livre de carrapatos, não apresentando sinais de anaplasnose durante a prenhez. O terneiro apresentou um quadro agudo de anaplasnose e, na necropsia foram encontradas lesões macro e microscópicas compatíveis com anaplasnose. O diagnóstico foi confirmado através da detecção do agente no material analisado, e de anticorpos para *A. marginale* pelo teste de Fixação de Complemento. A patogenicidade e infectividade do agente foram avaliadas através de inoculação de sangue desse animal em bovino jovem esplenectomizado, que duas semanas após, apresentou parasitemia e sinais clínicos característicos de anaplasnose.

Passos & Lima (1984), diagnosticaram, por distensão sangüínea corada com Giemsa, um caso de infecção vertical por *A. marginale* em um terneiro que estava

em condições ambientais controladas, livre de artrópodes vetores, em Minas Gerais. O animal apresentou mucosas anêmicas, parasitemia de 15 %, e esplenomegalia, com a presença do agente em distensões do baço. Não foram realizados exames sorológicos, e o animal morreu cinco dias após a esplenectomia.

Zaugg & Kuttler (1984), em experimento semelhante, constataram a transmissão *in utero* em animais afetados com anaplasnose aguda após 190 dias de gestação. Os autores observaram que os anticorpos colostrais e outros fatores maternos, aumentam o período pré-patente e determinam menores parasitemias, embora não impeçam a manifestação clínica da doença em animais desafiados.

Zaugg (1985), verificou que a infecção ocorre no segundo e terceiro terços da gestação, testando vacas nos três terços, através de inoculação de uma amostra estável (Virginia) de *A. marginale*. O sangue dos fetos foi obtido em vários estágios de desenvolvimento e inoculado em terneiros esplenectomizados, para que fosse avaliada a etapa da gestação em que ocorre a passagem do agente através da placenta.

Potgieter & Van Rensburg (1987), na África do Sul, diagnosticaram 12,5 % de transmissão transplacentária através do teste sorológico CAT (Card Agglutination Test) em terneiros produtos de matrizes cronicamente infectadas por *A. marginale*.

Salaberria & Pino (1988), detectaram a frequência de 86,4% de infecção em terneiros produtos de vacas com parasitemia nos dois últimos terços da gestação. Os autores concluem que a transmissão congênita pode ter grande importância na ocorrência de surtos de anaplasnose em terneiros, além de facilitar a infecção dos artrópodes vetores, e a veiculação da doença.

Ribeiro et al. (1995) inocularam sangue infectado via subcutânea em 11 vacas sorologicamente negativas para *A. marginale*, provocando a fase clínica da doença aos 19,6 dias, com parasitemia de 1,6 a 6,0 %, e comprovaram a passagem vertical do agente em 36 % dos animais (quatro terneiros), os quais apresentaram anticorpos para *A. marginale* detectados pelo teste DOT-ELISA. Não houve abortos devido ao monitoramento dos animais, o que impediu um grau acentuado de anemia.

Segundo Swift & Paumer (1978), o aborto na anaplasnose está relacionado com o grau de anemia da matriz, o que pode causar hipóxia do feto, levando-o à morte, principalmente no último terço da gestação, época em que, a exigência de oxigênio é maior.

Quanto à transmissão transplacentária em animais crônicos, Ribeiro et al. (1995), testando 97 soros fetais coletados em frigorífico, detectaram através da técnica de DOT-ELISA dois animais positivos (2,1 %), com anticorpos para *A. marginale* (fetos com idades entre 121 e 150 dias), provenientes de matrizes de área endêmica. No entanto, Piercy (1956) apud Ribeiro et al. (1995) e Kuttler et al. (1962), não detectaram transmissão transplacentária em terneiros oriundos de matrizes de área endêmicas, através de teste sorológico por Fixação de Complemento e de inoculação sangüínea em animais suscetíveis.

Na placenta bovina, os vasos sangüíneos fetais e os maternos estão separados por capas tissulares suficientemente grossas (as vilosidades coriais penetram no endométrio sem que este apresente modificações notáveis), o que impede a transferência de anticorpos (KOLB, 1976). Por outro lado, os fetos bovinos são capazes de formar anticorpos a partir dos 100 – 140 dias de idade, após uma infecção intrauterina (TRUEBLOOD et al., 1971). Por isso, a detecção de anticorpos em bovinos recém-nascidos, que ainda não tenham ingerido colostro, significa que ocorreu infecção intrtrauterina.

Embora vários autores tenham constatado a transmissão intrauterina de *A. marginale*, os mecanismos e a freqüência com que ocorre, são controversos, exigindo maiores estudos.

### **2.3 Diagnóstico de anaplasmose**

O exame parasitológico direto, por meio de esfregaço sangüíneo delgado e coloração de Giemsa consiste numa ferramenta importante de suporte ao diagnóstico clínico de anaplasmose (CALLOW et al., 1993). Entretanto, possui limitações devido à baixa sensibilidade durante a fase crônica da doença na qual há um reduzido número de eritrócitos infectados, os quais se localizam preferentemente em vasos sangüíneos de órgãos centrais (KESSLER & SCHENK, 1998).

A técnica de PCR permite diagnosticar a presença do DNA do agente em parasitemias de, pelo menos, 0,000025 %, sendo, portanto, altamente sensível (STILLER, 1992).

### **2.3.1 Exame direto: determinação do agente por PCR (Polymerase Chain Reaction)**

A seguir, descreve-se o princípio da técnica de PCR, segundo Sambrook (1989):

#### **2.3.1.1 Extração de DNA**

Nessa técnica, as células sangüíneas são lisadas pela adição da solução A (Proteinase K) e subsequente incubação a 65°C. As proteínas e lipídios são precipitados e extraídos pela adição da solução B (Sol. de precipitação protéica) e clorofórmio. A solução final é então centrifugada para separação em duas fases, com uma interface sólida. O DNA estará localizado na fase superior aquosa, as proteínas e lipídios na fase sólida e o clorofórmio na fase inferior. O DNA é então removido, precipitado com etanol e resuspenso em água.

#### **2.3.1.2 Amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR)**

É uma técnica de amplificação *in vitro* de fragmentos específicos de DNA (no caso, o gene *msp5*), que utiliza a enzima DNA polimerase termoestável. Esta reação é realizada em um aparelho denominado termociclador, que permite a repetição de ciclos de diferentes temperaturas nas quais as três fases da PCR (desnaturação, anelamento e extensão) ocorrem em cadeia.

#### **2.3.1.3 Análise do produto de PCR em gel de agarose (SAMBROOK et al., 1989)**

Os fragmentos de DNA podem ser separados por meio de eletroforese em gel. Nessa técnica, os fragmentos de DNA, que são eletronegativos, migram em direção a um pólo positivo (ânodo).

Os fragmentos separados podem ser visualizados por exposição direta à luz ultravioleta (UV), após coloração com brometo de etídio.

O objetivo da técnica é avaliar a amplificação do fragmento de DNA correspondente ao gene *msp5* de *A. marginale*.

### 2.3.2 Exame Indireto: Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos para *A. marginale*

Segundo Madruga et al. (2001), este exame permite a visualização da reação antígeno-anticorpo por meio da marcação de uma antiimunoglobulina com fluorocromos (Figura 2). Estas são substâncias com capacidade de absorção de energia luminosa, tornando-se excitadas por um breve período de tempo ( $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  segundos) e em seguida emitindo-a em forma de fluorescência ao retornar ao seu estado normal. Os fluorocromos mais freqüentemente usados são os derivados da rodamina, com emissão de fluorescência vermelha e o isotiocianato de fluoresceína (FITC) que emite fluorescência verde.

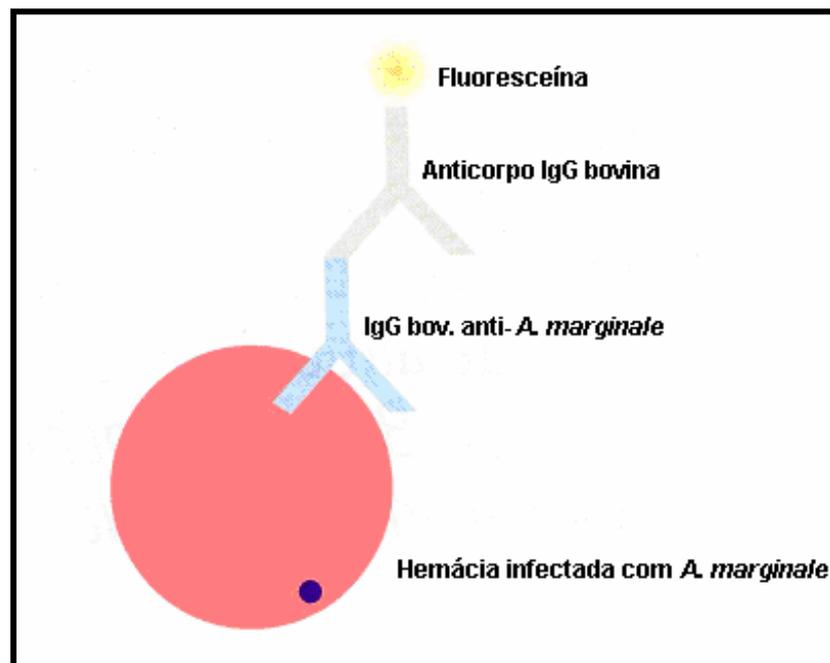


Figura 2. Representação esquemática da Reação de Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos para *A. marginale* (adaptado de MADRUGA et al., 2001).

### 2.3.3 Exame Indireto: Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA Indireto) para detecção de anticorpos para *A. marginale*

Segundo Madruga et al. (2001), nos testes de imunoadsorção enzimática (ELISA), as reações antígeno-anticorpo são detectadas através da conjugação de um dos componentes do complexo com uma enzima, que age sobre um substrato, produzindo uma coloração detectável visualmente e mensurada por espectrofotometria (Figura 3).

Utiliza uma superfície sólida para imobilização do antígeno ou anticorpo, o que favorece a remoção dos componentes não reativos por lavagem.

O antígeno relevante é adsorvido a uma superfície sólida (microplaca de poliestireno). O soro a ser testado é incubado e os anticorpos específicos contra esse antígeno ligam-se a ele, e os não específicos são removidos por lavagem.

Um segundo anticorpo conjugado a uma enzima, é dirigido ao primeiro anticorpo, e posteriormente incubado.

Por último, adiciona-se um substrato que, sofrendo ação enzimática, produzirá uma coloração de intensidade proporcional à concentração de anticorpos pesquisados.

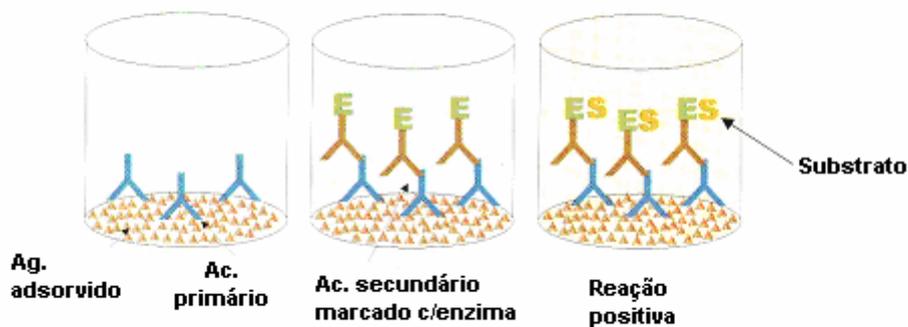


Figura 3. Representação esquemática de um ensaio de ELISA Indireto para pesquisa de anticorpos para *A. marginale* (MADRUGA et al., 2001).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Locais de execução do experimento

O experimento foi realizado na Estância Bela Vista, no Município de Capão do Leão, RS, cuja localização é 31° 45'48'' S, 52° 29'02'' W, e altitude média de 21 m.

A preparação das papas de hemácias destinadas ao exame direto por PCR e a extração de soro sanguíneo para exame indireto por RIFI e ELISA Indireto, foram realizadas no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, RS.

A execução das técnicas laboratoriais de diagnóstico ocorreu no Laboratório de Sanidade Animal do Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte (CNPGC) da EMBRAPA de Campo Grande, MS.

### 3.2 Delineamento experimental

O experimento foi delineado considerando que não ocorre a transferência de imunoglobulinas através da placenta bovina e que esses fetos são imunocompetentes a partir dos 100 dias de concepção. Desse modo, a constatação de anticorpos específicos no soro sanguíneo de terneiros recém-nascidos, que não tenham ingerido colostro, assim como a identificação de DNA de *A. marginale*, indicariam infecção intrauterina pelo agente.

Foi coletado sangue do terneiro ao nascimento, antes de ingerir o colostro (com a finalidade de detectar anticorpos para *A. marginale* produzidos por ele durante a vida fetal, e DNA da rickettsia que o estivesse infectando), e da matriz (através dos mesmos exames buscou-se detectar a condição de portadora do agente e a presença de anticorpos específicos). Após três dias do nascimento, novamente foi coletado sangue dos terneiros para verificar a presença de anticorpos colostrais.

### 3.2.1 Animais experimentais

Os animais utilizados no experimento foram matrizes (n=30) pertencentes a um rebanho de área marginal para o carrapato *B. microplus*, porém sem histórico de anaplasmose durante a gestação, e seus respectivos terneiros (n=30). Os terneiros do experimento nasceram no período compreendido entre 15 de outubro e 07 de dezembro de 2004 (Figura 4).

As matrizes tinham o tipo racial mestiço, com participação majoritária da raça Limousin e, em menor grau, das raças Nelore, Aberdeen, Red Angus, Braford, Hereford e Ibagé e foram inseminadas com sêmen de touros Braford e, posteriormente o repasse foi feito com touros Limousin.



Figura 4. Animais experimentais da Estância Bela Vista, Capão do Leão, RS. Foto obtida logo após a coleta de sangue, anterior à ingestão de colostro.

O manejo utilizado na propriedade é o geralmente aplicado na região, ou seja, uso de endectocidas, banhos carrapaticidas com Amitraz segundo a demanda do momento, pastoreio contínuo sobre campo nativo, sincronização dosaios e, inseminação artificial.

Os animais experimentais encontram-se expostos ao carrapato *B. microplus*, a dípteros hematófagos e são submetidos a manejos onde pode haver

inoculação acidental de sangue de outros bovinos, como, por exemplo, durante a aplicação de injetáveis e pequenas cirurgias.

A adequação da lotação é determinada segundo a condição corporal dos animais.

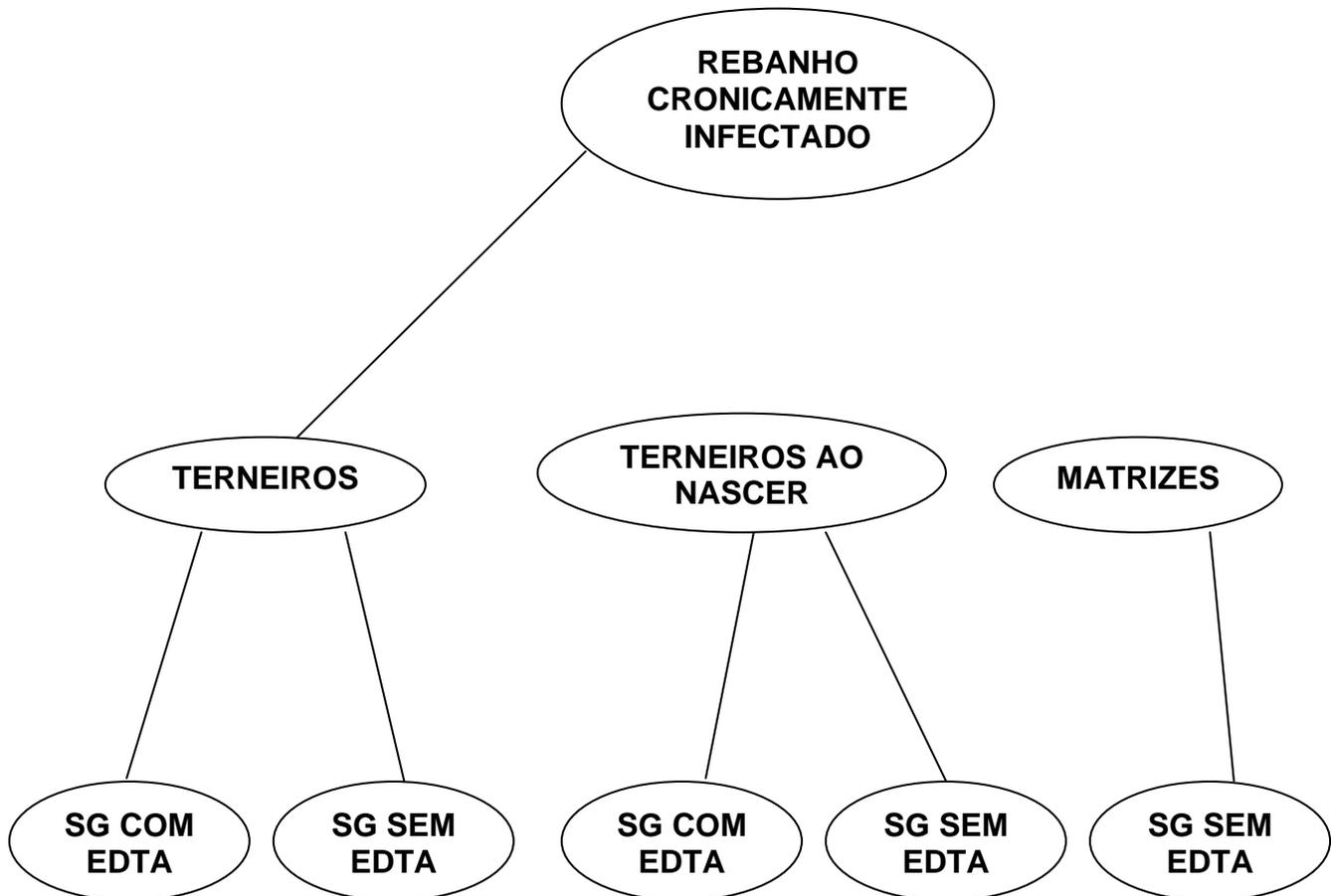
### **3.2.2 Obtenção das amostras de sangue**

Foi coletado sangue da veia jugular das matrizes após o parto e de seus respectivos terneiros ao nascer (antes de ingerir o colostro) e aos três dias de vida. Utilizou-se tubos tipo Vacutainer com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para obtenção de papas de hemácias para PCR e, sem anticoagulante para extrair o soro destinado aos testes de RIFI e ELISA Indireto (Fig. 5)

O material foi conservado sob refrigeração a 4° C e transportado até o Laboratório de Parasitologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da UFPel.

As amostras sem anticoagulante foram centrifugadas a 3500 RPM por três minutos e extraídos os soros em frascos tipo “ependorfes” de 2,5 ml devidamente identificados, que foram posteriormente conservados em freezer a 20° C. Já as amostras com EDTA também foram centrifugadas a 3500 RPM por 3 minutos, retirado o plasma e as células brancas, ficando as papas de hemácias. Este material permaneceu nos tubos de coleta, para evitar contaminação, e foi conservado em freezer a -20° C, até serem transportados com gelo seco ao Laboratório de Sanidade Animal da EMBRAPA Gado de Corte de Campo Grande, MS.

**Figura 5- Fluxograma das coletas de sangue e exames**



### **3.3 Execução das Técnicas Laboratoriais**

#### **3.3.1 Detecção do DNA de *A. marginale* por PCR**

##### **3.3.1.1 Extração do DNA (Kit Easy DNA)**

Todos os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente. Da amostra de sangue homogenizado foram retirados 350 µl para um tubo de microcentrífuga de 2 ml, adicionando-se 500 µl da solução A (solução de lise celular: Proteinase K), seguindo-se homogeneização por inversão várias vezes e incubação a 65° C por 6 minutos, em banho-maria. Após, foram adicionados 900 µl de clorofórmio e seguindo-se agitação vigorosa em *vortex*, até a porção líquida fluir

livremente e a hemoglobina apresentar um aspecto de partículas cobertas de chocolate. Neste momento foram adicionados 200 µl da solução B (solução de precipitação protéica: 6 ml de um solução de acetato de K 5M; 1,1 ml de ácido acético glacial; 2,9 ml de água destilada) e novamente homogenizado em *vortex*, até a amostra tornar-se uniformemente viscosa. Após, foi centrifugada em velocidade máxima (13.500 rpm) por 10 minutos; a fase aquosa foi retirada para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, e adicionado 1 ml de etanol absoluto em temperatura ambiente, seguindo-se nova homogeneização por inversão até formar um precipitado (este deveria ser visto entre 30 a 60 segundos e, no caso de não ter sido visualizado, se esperaria mais 10 minutos). Após este período, o material foi centrifugado em velocidade máxima por 2 minutos; o sobrenadante desprezado e adicionado 1 ml de etanol 70 %; nova centrifugação em velocidade máxima por 2 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Foi feita uma última centrifugação em velocidade máxima por 1 minuto, quando foram removidos resíduos de etanol com auxílio de uma pipeta, e invertendo-se os tubos para secagem. Ao “pellet” foram adicionados 100 – 150 µl de água ultrapura, homogeneizando-se levemente e incubando-se a 65°C por 5 minutos em banho-maria.

### **3.3.1.2 Amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia da polimerase PCR para *msp5* de *A. marginale*, segundo Araújo et al. (2002)**

O material obtido na etapa anterior foi colocado em um tubo de polipropileno para PCR de 200 µl, para amplificação do gene *msp5* de *A. marginale*, conforme descrito a seguir:

- DNA de *A. marginale*, variável de acordo com a concentração (ng).
- Tampão 10 x para *Taq* DNA polimerase.....5 µl.
- dNTPs (concentração final para cada dNTP: 0,2 mM).....1 µl.
- Primer *msp5* F (100 ng/µl).....1 µl.
- Primer *msp5* R (100 ng/µl).....1 µl.
- *Taq* polimerase (5 U/µl).....1 µl.
- Água ultrapura q.s.p.....50 µl.

Primer *msp5* F: (5` - ATGAGAATTTTCAAGATTGTGTCTAACCTT – 3`)

Primer *msp5* R: (5` - AGGAAAGCCCCCAAAGCCCCATACTT – 3`)

Os “primers” foram desenhados para amplificar o gene *msp5* de *A. marginale* baseados na seqüência dos nucleotídeos de *msp5* (Gen Bank, acesso M93392, [www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) ).

A amplificação do gene *msp5* foi realizada em termociclador da seguinte forma:

94°C em 1 minuto;            1 ciclo  
94°C em 1 minuto;  
55°C em 1 minuto;            35 ciclos  
72°C em 30 segundos;  
72°C em 10 minutos;        1 ciclo  
4°C infinito.

### 3.3.1.3 Análise do produto de PCR em gel agarose (Sambrook, 1989)

As reações de PCR foram visualizadas em Gel agarose 1% corados com brometo de etídeo (0,5 ng/ml). O marcador de peso molecular utilizado foi o 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®) e o tamanho de fragmento amplificado foi de 700 pb.

Foi preparado o gel de agarose a 1 % em TAE (Tris Ácido Acético/EDTA). A dissolução do gel foi feita através de aquecimento em forno de microondas, a fim de não restarem resíduos de agarose não dissolvida; aguardou-se o gel esfriar até aproximadamente 60°C; logo adicionou-se 30 ml de gel na cuba e se inseriu o pente; aguardou-se a gelificação; preencheu-se a cuba com tampão TAE até cobrir o gel completamente e preparou-se as amostras da seguinte forma: 2 µl de tampão da amostra 6x, 3 µl de TAE e 5 µl do produto de PCR. O pente foi retirado lentamente e as amostras aplicadas com cuidado às amostras nos poços do gel; aplicou-se 10 µl do marcador de pares de bases.

A corrida foi realizada a 80–90 V, observando-se a migração do corante, e interrompendo-se a mesma quando esta alcançou 2/3 do gel.

Logo após a retirada do gel, este foi imerso em banho de brometo de etídeo a 0,5 g/ml por 10 a 30 minutos, e descorado em banho de água por 10 a 20 minutos.

As bandas foram visualizadas em transiluminador, sempre protegendo a pele e os olhos da exposição direta à luz ultravioleta.

Os testes de PCR foram realizados em triplicatas para cada amostra testada.

### **3.3.2 Determinação de IgG específica para *A. marginale* por Imunofluorescência Indireta**

Foram utilizadas, como antígeno, lâminas (distensões) obtidas junto ao Laboratório de Protozoologia, Sanidade Animal da EMPRAPA-CNPGC, confeccionadas com sangue colhido de bovinos experimentais com altas parasitemias, segundo Madruga et al. (2001).

As lâminas foram retiradas do ultrafreezer (-85°C) e colocadas em estufa a 37°C por 10 minutos. Após, foram desenhados 23 círculos com esmalte para unhas, nos quais foram despositados 10 µl dos soros testes e controles, diluídos previamente a 1:160 e 1: 320 em PBS ( tampão salino fosfatado), pH 7,2, e um círculo somente com PBS para controle de especificidade da prova. As lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Posteriormente, foram lavadas com PBS por 3 vezes, sob fraca agitação, e incubadas por 10 minutos. Após, adicionou-se 10 µl do conjugado (anti-IgG bovina, marcada com isotiocianato de fluoresceína), diluído a 1:160 em PBS, pH 7,2. A seguir, foram incubadas em câmara úmida a 37° C por 30 minutos e novamente lavadas sob fraca agitação por duas vezes com PBS, pH 7,2 por 10 e 5 minutos, respectivamente. As lâminas foram secas em ambiente escuro e a leitura foi feita em microscópio óptico de imunofluorescência com lâmpada HBO de alta pressão de mercúrio de 50 W, com filtro de 450 nm, oculares de 10 X e objetiva de 40 X.

### **3.3.3 Determinação de IgG específicas para *A. marginale* por ELISA Indireto**

O teste de Elisa Indireto foi realizado segundo Madruga et al. (2001).

As IgG específicas foram determinadas pela prova de ELISA (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática Indireto ), utilizando o Antígeno Bruto de *A. marginale* N ° 8674–72%, produzido pela EMBRAPA Gado de Corte MS com data de elaboração em 30/02/98.

Foram utilizadas placas de microtitulação marca COSTAR 3590 de 96 poços, lote 30104010, nas quais foram adsorvidos o Antígeno Bruto diluído em TCB (Tampão Carbonato Bicarbonato), pH 9,2 a razão de 1:2000. A adsorção foi de 4 horas a 4°C, com posterior congelamento a -20°C *overnight*. As placas foram lavadas 5 vezes (Lavadora LP 35 Diagnostics PASTEUR) com PBST 0,1 %. Os soros controle (++) e (-) e os soros teste foram diluídos 1:1000 e o soro controle (+) a 1:5000, adicionados 50 µl/poço e incubados por 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Após 5 lavagens com PBST 0,1 % (Tampão Salino Fosfatado com *tween*, pH 7,2), adicionou-se a Anti IgG Bovina conjugada (SIGMA®) à Peroxidase A 7414, diluída 1:20000 em PBST 0,1% seguido de incubação por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Após, foram feitas 10 lavagens em PBST 0,1 % e adicionado o Substrato OPD 9 (Ortho-phenyl-diamine) 3,75 mg diluído em 1,5 ml de Ácido Cítrico, 1,6 ml de Fosfato Dissódico Anidro, 3,125 ml de água destilada e Peróxido de Hidrogênio 30 % (MERCK®) 3,75 µl.

A reação foi interrompida através de adição de Ácido Sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,4 M).

Os resultados foram obtidos em densidade óptica (DO) por meio de um leitor de ELISA (BIOTEK ELX 800 GIDX) com filtro de 490 nanômetros, acessando o programa “xCheck” .

O “Cut-off”, limiar entre os positivos e os negativos, foi obtido pela média da Densidade Óptica dos negativos acrescida de três desvios padrões. É dado em D.O. com nível de confiança de 99,8%. As análises foram feitas em triplicatas.

### **3.4 Indicadores epidemiológicos e análise estatística**

A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e precisão dos testes foram avaliadas segundo Coggon et al. (1993), utilizando-se o resultado do PCR como padrão.

A comparação entre as prevalências de soropositivos detectadas pelas técnicas de RIFI e ELISA foi feita através do teste Qui-quadrado, com intervalo de confiança de 95%.

O teste exato de Fisher foi usado para comparar sensibilidade e especificidade das duas técnicas.

### **3.5 Dados climáticos**

Os dados climáticos relativos ao período experimental (2004) bem como as médias correspondentes aos últimos 30 anos, foram obtidos junto à Estação Agroclimatológica de Pelotas – Campus da UFPel (EMBRAPA/ETB). Estes dados foram: médias mensais das temperaturas máximas, médias, mínimas, da umidade relativa do ar e da precipitação pluviométrica.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Dados climáticos

O ano de 2004 apresentou características climáticas favoráveis para o desenvolvimento de carrapatos e dípteros hematófagos entre os meses de setembro e abril, e desfavoráveis de maio a agosto, por apresentar temperaturas médias inferiores a 15°C ainda que, com umidade relativa do ar de 80% (Figura 6).

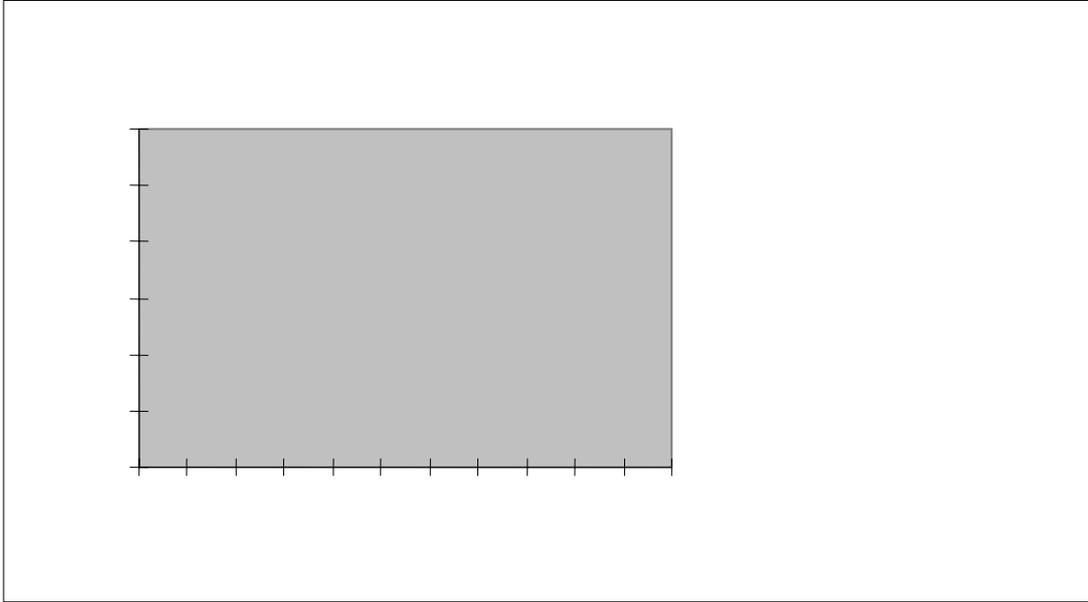
Nos meses em que as condições climáticas foram desfavoráveis aos vetores, as matrizes estavam no segundo terço da gestação e quando as condições climáticas tornaram-se favoráveis, com UR % variando entre 72,2 % e 84,6% e temperaturas médias entre 16,2°C e 21,7°C, estavam no último terço de gestação. Condições climáticas similares foram verificadas por Castro (2001), segundo o qual a população de dípteros aumenta a partir de setembro e é drasticamente reduzida na metade do outono, nessa região.

### 4.2 Diagnóstico de *A. marginale*

No teste direto, pesquisa do DNA de *A. marginale* por PCR, o resultado obtido nas 30 matrizes revelou 19 animais positivos (63,3 %) e 11 negativos (36,6%) na alíquota estudada.

O estudo realizado nos 30 terneiros ao nascimento, resultou em dois animais positivos (6,7 %) e 28 negativos (93,3 %) (Figuras 7 e 8).

Considerando o grupo de matrizes com resultado positivo ao PCR, detectou-se uma passagem intra-uterina do *A. marginale* de 10,5% (n=2).



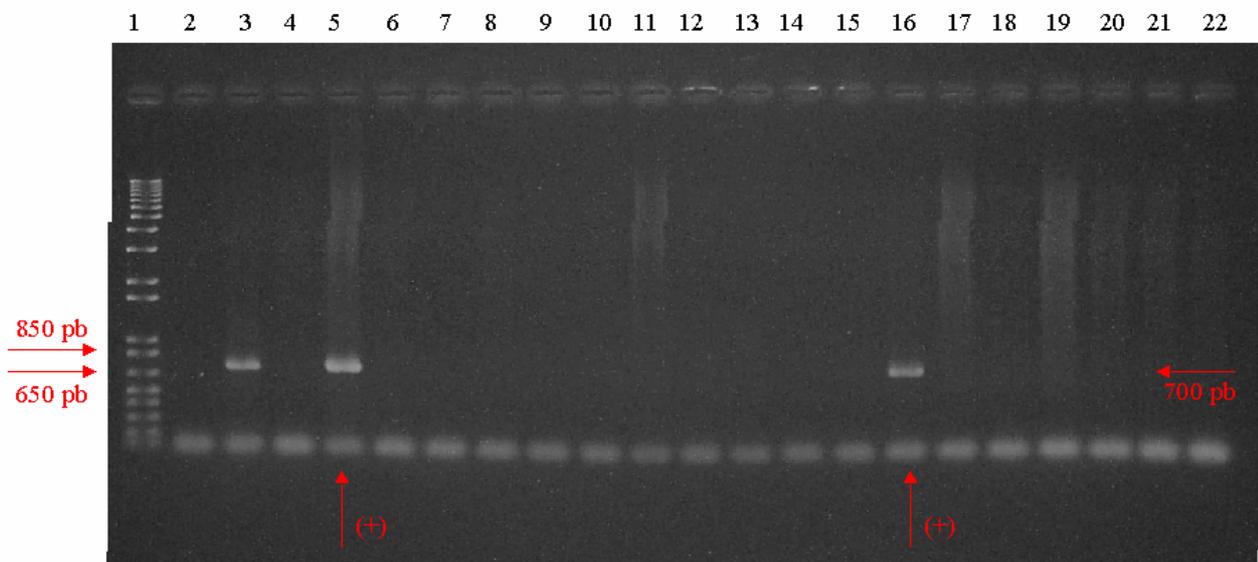


FIGURA 7. Reações em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico de *A. marginale* em amostras de DNA de sangue dos terneiros ao nascer, antes da ingestão do colostro. 1- Marcador de pb 1Kb Plus "ladder"(Invitrogen®); 2- Controle (-); 3- Controle (+); 5 e 16- Amostras positivas (terneiros nº 2 e 13).

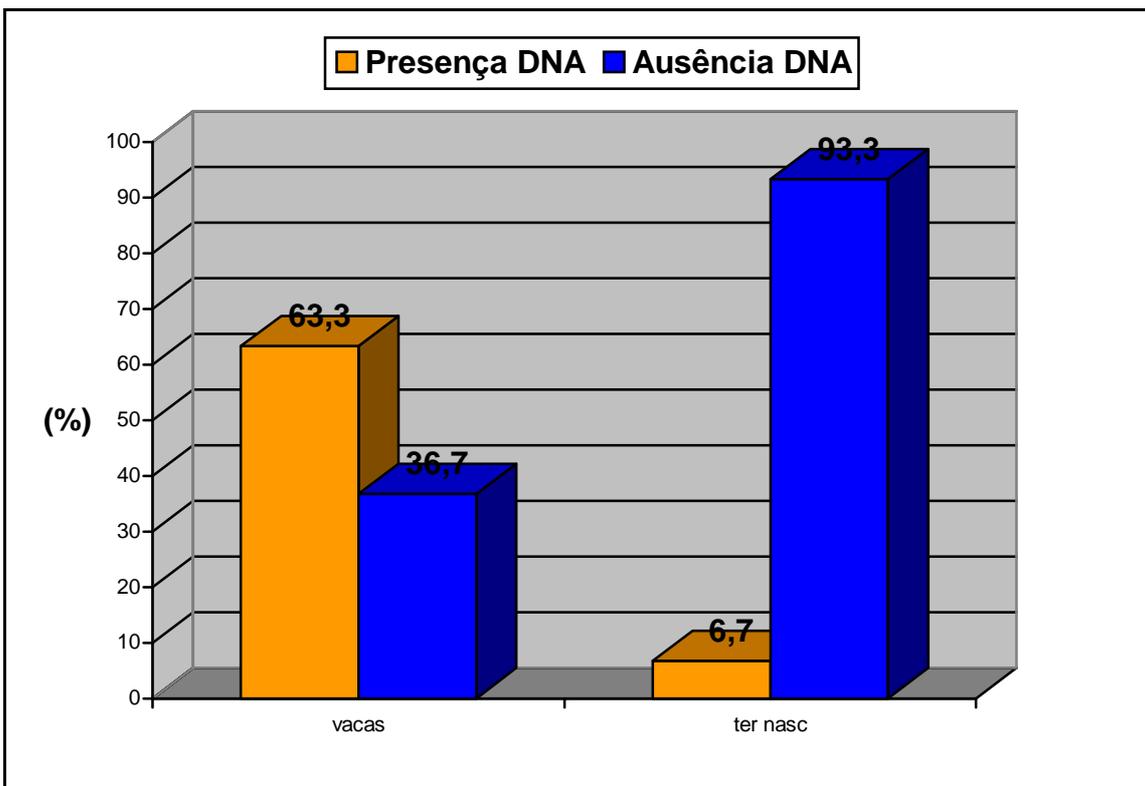


Figura 8. Porcentagens de matrizes e ternos ao nascer com presença de DNA de *A. marginale* diagnosticado por PCR.

Os resultados obtidos na RIFI em ambas as diluições dos soros das matrizes, revelaram que 100 % delas tinham anticorpos da classe IgG para *A. marginale*. Essa alta prevalência de soropositivos nos adultos, não caracteriza necessariamente, uma situação de estabilidade enzoótica, pois pode ser devida à grande duração dos anticorpos IgG (até 22 meses), segundo James (1983) e à variação de inóculo que pode ocorrer de um ano a outro, devido às populações de dípteros hematófagos, os quais são altamente influenciáveis pelas condições climáticas (SILVA, 2003). Ao nascerem, três (10 %) dos 30 terneiros nascidos dessas matrizes, foram positivos na RIFI e 27 negativos (90%) (Figura 9). Resultado semelhante a este, foi obtido por Potgieter & Van Rensburg (1987) em um rebanho com infecção crônica, onde foi constatada uma frequência de transmissão transplacentária de 12,5%, utilizando como teste sorológico o Card Agglutination Test (CAT).

Em 66,7% (2/3) dos terneiros positivos com IgG anti-*A. marginale* detectados por RIFI, foi achado DNA do parasito pelo PCR.

É provável que na alíquota do terneiro Nº 29 (único positivo na RIFI e negativo no PCR) não houvesse o DNA do *A. marginale*, ou é possível também, que o soro em questão, seja um falso positivo, já que o RIFI apresenta menor especificidade quando comparado com ELISA Indireto (MADRUGA et al., 2001) e com o PCR como Padrão Ouro (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998).

Zaugg (1985) considera que o inóculo que passa ao feto pode permanecer por pouco tempo, suficiente apenas para estimular a resposta imune. Por isso o animal recém nascido, embora tenha anticorpos específicos, não apresentou DNA de *A. marginale*.

Todos os terneiros em estudo (100%) foram positivos na RIFI aos três dias de vida, por terem ingerido IgG colostrar, o que indica a eficiência de transferência de IgG por essa via. Esses dados concordam com o verificado por Silva (2003), que observou que 100% dos terneiros com 5 – 15 de idade estavam soropositivos para *A. marginale*, em um rebanho em condições epidemiológicas similares às do presente experimento.

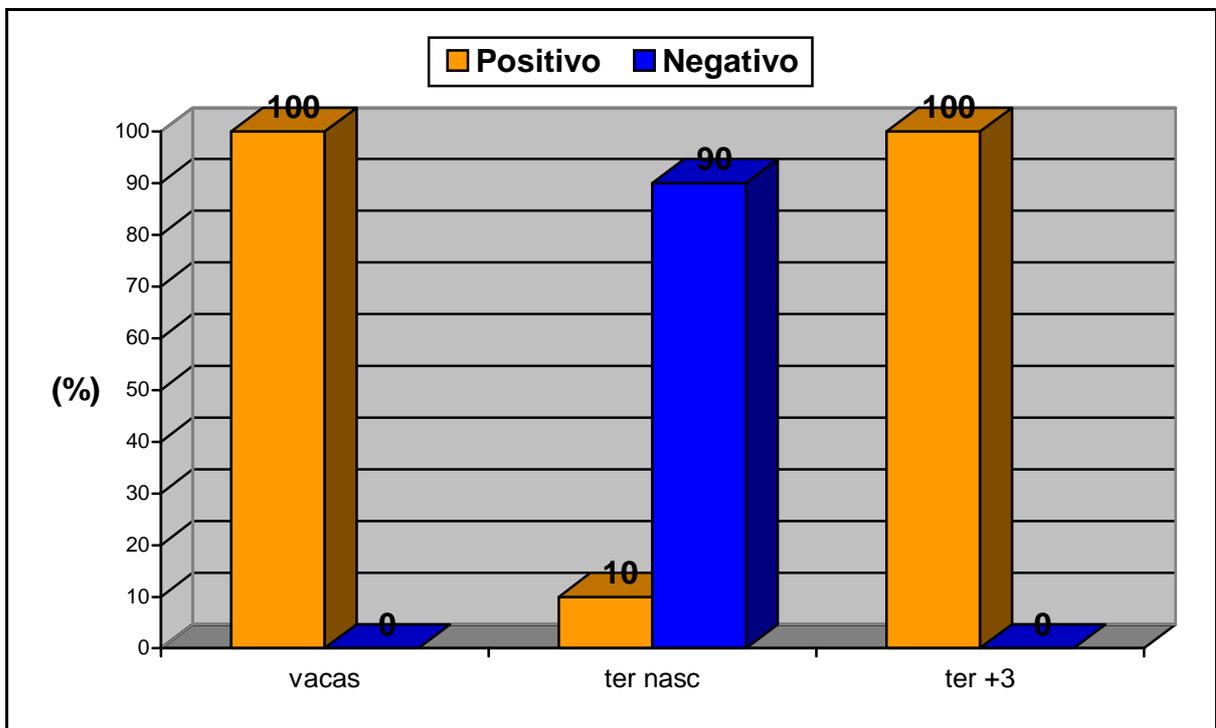


FIGURA 9 – Porcentagens de matrizes, terneiros ao nascer e terneiros aos 3 dias do nascimento, soropositivos para *A. marginale* diagnosticados pela RIFI.

Os resultados obtidos por ELISA Indireto, frente a diluições de 1:1000, foram os seguintes: nas 30 matrizes, se detectou 29 animais positivos (97%) e 1 negativo (3%) e, nos terneiros ao nascer, 0% de positivos e 100% negativos, portanto, este teste não comprovou passagem vertical (Fig.10). Este resultado nos terneiros recém nascidos pode-se dever à baixa concentração de anticorpos circulantes, e também à maior diluição dos soros testes (1:1000 no ELISA e 1:160 e 1: 320 no RIFI).

Considerando o grupo de matrizes com resultado positivo ao PCR, detectou-se uma passagem intra-uterina de *A. marginale* de 10,5%. Índice similar (10%) de transmissão foi obtido quando foram analisadas matrizes e terneiros na RIFI (Figura 11).

A transmissão transplacentária de *A. marginale* em bovinos, comprovada neste experimento, também foi verificada por Ribeiro et al. (1995), que analisaram soros de fetos coletados no segundo terço da gestação em frigorífico em Minas Gerais. Os autores obtiveram índices de passagem intra-uterina de 2,1%, mas é provável que fosse maior em matrizes ao final da gestação, como no presente experimento, uma vez que haveria mais tempo para a transmissão, bem como para o desenvolvimento da resposta imune pelo fetos.

Também Norton et al. (1983), em Queensland, Austrália, estudando a transmissão transplacentária em seis vacas pré-imunizadas originárias de área endêmica para o *B. microplus*, sem histórico de infecção clínica durante a prenhes, constataram anaplasmose aguda em um terneiro ao nascer (16,6%), com confirmação histopatológica e sorológica (Fixação de Complemento) do diagnóstico.

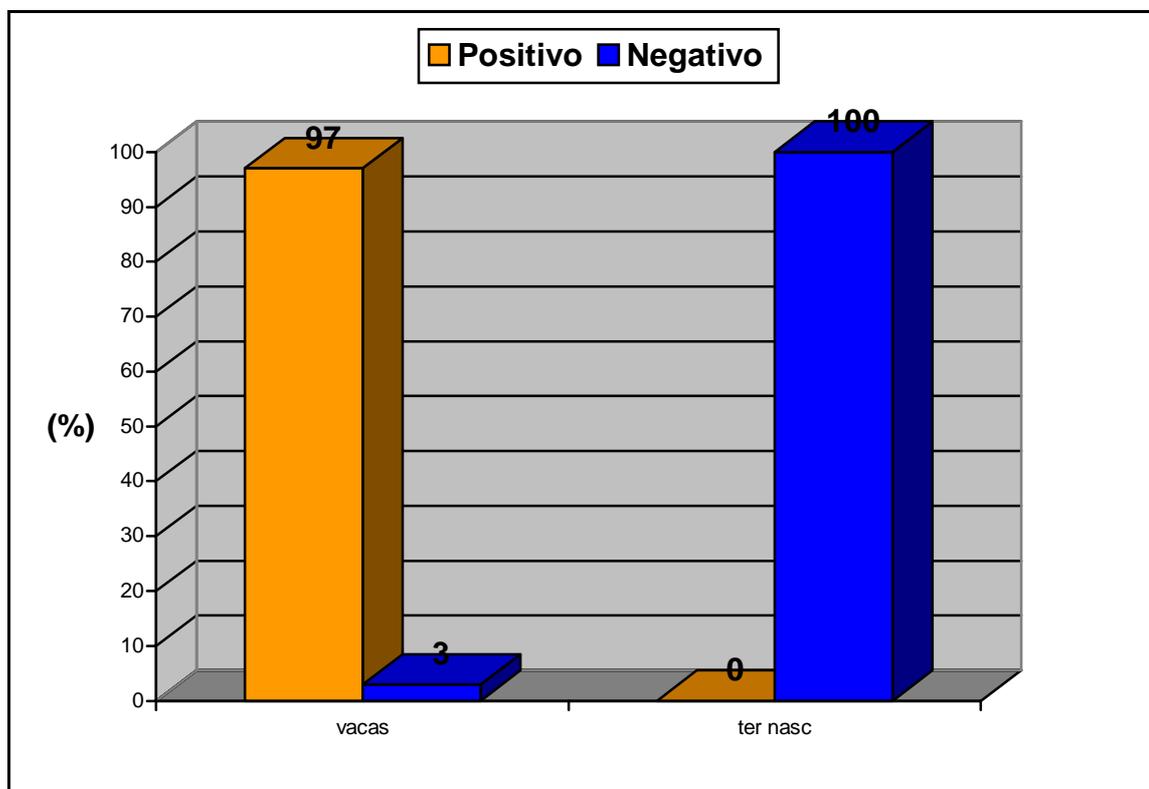
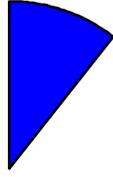


Figura 10. Percentagens de soropositivos nas matrizes e terneiros ao nascer, diagnosticadas por ELISA Indireto.



### 4.3 Comparação entre as Técnicas de RIFI e ELISA Indireto

A Tabela 1 apresenta os resultados detectados pela RIFI e pelo ELISA Indireto nos 60 soros (30 das matrizes e 30 dos terneiros ao nascer) dos bovinos da Estância Bela Vista, os quais foram agrupados segundo a concordância dos resultados. As diferenças entre prevalências detectadas pelos dois testes (55% e 48,3%, respectivamente) não foram estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ) segundo o teste de Qui-quadrado.

TABELA 1. Distribuição dos resultados das Técnicas de RIFI e ELISA I. para *A. marginale*, em soros de 30 matrizes e 30 terneiros ao nascer.

RIFI	ELISA I.		
	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	29	4	33
NEGATIVO	0	27	27
TOTAL	29	31	60

Dos 60 soros analisados, 29 foram RIFI+/ELISA+ (índice de co-positividade de 87,9%) e 27 foram RIFI-/ELISA- (índice de co-negatividade de 100%), correspondendo a uma concordância de 93,3% entre ambos os testes, segundo Coggon et al (1993) (Anexo I). Aplicando o índice Kappa, segundo Smith (1995) o valor obtido foi 0,87 indicando uma concordância quase perfeita entre os testes (Anexo II).

Esta concordância é semelhante à obtida por Madruga et al. (2000), de 96%, que avaliaram um teste de ELISA para detecção de anticorpos para *A. marginale*, a partir de corpúsculos iniciais obtidos de terneiros esplenectomizados e com riquetsemia de 80%.

Ao estudar os resultados obtidos, separadamente, nos soros coletados de animais adultos, a concordância entre as duas técnicas (ELISA e RIFI) foi de 96,6%, enquanto que, nos soros dos terneiros ao nascer, a concordância caiu para 90%.

Possivelmente, essa diferença esteja ligada a uma menor concentração de anticorpos circulantes no terneiro recém nascido, como constatado por Silva (2003), reduzindo a probabilidade de sua detecção pelo teste de ELISA.

Para validação de provas sorológicas, existem técnicas de alta sensibilidade como o PCR que detecta uma média de 30 eritrócitos/ml de sangue o que permite que seja utilizada como prova de referência para validação dos testes sorológicos (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998; GALE et al., 1996).

O teste de Imunofluorescência Indireta apresentou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 69,2% em relação ao padrão PCR (Tabela 2). Resultados similares (100% e 71,7%, respectivamente) foram constatados por Braz Júnior et al. (1997), ao comparar a prova de RIFI com ELISA Indireto.

TABELA 2. Resultados e análise de validade dos testes de RIFI para *A. marginale* de 30 vacas e 30 terneiros ao nascer, em relação a PCR (Padrão Ouro)

RIFI	PCR		
	<i>POSITIVO</i>	<i>NEGATIVO</i>	<i>TOTAL</i>
<i>POSITIVO</i>	21(a)	12(b)	33
<i>NEGATIVO</i>	0(c)	27(d)	27
<i>TOTAL</i>	21	39	60

Segundo Coggon et al. (1993):

Sensibilidade:  $a / (a+c) \times 100 = 100 \%$

Especificidade:  $d / (b+d) \times 100 = 69,2 \%$

Valor Preditivo (+):  $a / (a+b) \times 100 = 63,6 \%$

Valor Preditivo (-):  $d / (c+d) \times 100 = 100 \%$

Precisão:  $(a+d) / (a+b+c+d) \times 100 = 80 \%$

Ao comparar os resultados do teste de ELISA com a técnica padrão ouro (PCR) constatou-se que o teste de ELISA Indireto teve uma sensibilidade de 85,7% e uma especificidade de 71,8% (Tabela 3), índices inferiores aos verificadas por Madruga et al. (2000). Braz Júnior et al. (1997), constataram índices de sensibilidade de 100% e especificidade de 94,8% para a prova de ELISA, superiores às verificadas no presente experimento.

As variações entre as performances das técnicas verificadas entre diferentes trabalhos podem ser explicadas pelo antígeno utilizado e especificação das técnicas (por exemplo, ELISA competitivo, indireto ou sandwich indireto de duplo anticorpo) (MADRUGA et al., 2001), assim como pela qualidade dos reagentes e equipamento.

TABELA 3. Resultados e análise de validade dos testes de ELISA para *A. marginale* de 30 vacas e 30 terneiros ao nascer, em relação a PCR (Padrão Ouro)

ELISA INDIRETO	PCR		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	18(a)	11(b)	29
NEGATIVO	3(c)	28(d)	31
TOTAL	21	39	60

Segundo Coggon et al. (1993):

Sensibilidade:  $a / (a+c) \times 100 = 85,7 \%$

Especificidade:  $d / (b+d) \times 100 = 71,8 \%$

Valor preditivo (+):  $a / (a+b) \times 100 = 62,1 \%$

Valor preditivo (-):  $d / (c+d) \times 100 = 90,3 \%$

Precisão:  $(a+d) / (a+b+c+d) \times 100 = 76,7 \%$

Segundo Braz Júnior et al. (1997), a maior especificidade de uma prova de diagnóstico indica uma menor probabilidade de resultados falso-positivos. Esses testes de elevada especificidade são muito importantes para a detecção de animais soronegativos em áreas de instabilidade enzoótica para *A. marginale*.

Este experimento permitiu estabelecer a importância da transmissão vertical do agente estudado no processo epidemiológico da doença, no contexto de uma dinâmica de infecção pela rickettsia que depende das características da população, da capacidade de transmissão dos artrópodes vetores assim como da suscetibilidade dos bovinos expostos e das condições ambientais de instabilidade enzoótica.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste experimento geram as seguintes conclusões:

- Ocorre transmissão transplacentária em terneiros nascidos de vacas cronicamente infectadas com *Anaplasma marginale* , sem histórico de agudização do processo

## 6 REFERÊNCIAS

Araújo, F.R.; Dos Santos, L.R.; Madruga, C.R.; Fragoso, S.P.; Umaki, A.C.S.; Soares, C.O.. Clonagem e expressão do gene *msp5* de um isolado brasileiro de *Anaplasma marginale*. **Circular Técnica Nº 29**. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, 2002.

Artiles, J.; Alves Branco, F.P.; Martins, J.R.; Correa, L.B.; Sapper, M.F.M.. Prevalência de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* no município de Bagé, RS. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.2, n.4. s.1, p.179, 1995.

Amerault, T.E.; Mazzola, V.; Roby, T.P.. Gram-staining characteristics of *Anaplasma marginale*. **Am. J. Vet. Res.**, v.34. p.552-555, 1973.

Bird, J.E.. Neonatal anaplasmosis in calf. **J.S. Afr. Vet. Assoc.**, v.44, p.69-70, 1973.

Braz, C.J.; Passos, L.M.F.; Lima, J.D.; Ribeiro, M.F.B.. Comparison between ELISA and Indirect Fluorescent Antibody Test in the detection of antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 49 (5), p.543-549, 1997.

Callow, L.L.; Rogers, R.J.; De Vos, A.J.. Tick-borne diseases: cattle-pathology and serology. In **AUSTRALIAN standard diagnostic techniques for animal diseases**, Corner, CSIRO Information Services, p.1-16, 1993.

Coggon, T.; Rose, G.; Barker, D.J.. Measurement, error and bias, p.20-25. In: Coggon, T.; Rose, G.; Barker, D.J. (ed.) **Epidemiology for the Uninitiated**. 3<sup>rd</sup> ed. BMJ Publishing Group, London, 1993.

Dykstra, R.R.; Roderick, L.M.; Farley, H.; McMahan, V.K.; Splitter, E.J.. Studies in anaplasmosis II. **Kansas Agr. Expt. Sta. Tech. Bull**, v.66, p. 1-24, 1948.

Erikis, I.S.; Palmer, G.H.; McGuire, T.C.. Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. **J. Clin. Microbiol.**, v.27, p.279-284, 1989.

Fowler, D.; Swift, B.. Abortion in cow inoculated with *Anaplasma marginale*. **Therionenology**, v.4, p.59-67, 1975.

Gates, D.W.; Roby, T.O.; Amerault, T.E.; Anthony, D.W.. Ultrastruture of *Anaplasma marginale* fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide.

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

Kocan, K.M.; Blouin, E.F.; Barbet, A.F.. Anaplasmosis control: past, present and future. **Annals of the New York Academy of Science**, v.916, n.1, p.501-509, 2000.

Kolb, E.. Funciones de la placenta. In.: **Fisiología Veterinaria**. Vol. II. 2da ed. española de la 3ra ed. alemana. Editorial Acribia, Zaragoza, España, p.775-779, 1976.

Kuttler, K.L.; Marble, D.W.; Matthews, N.J.. Anaplasmosis complement-fixation responses in calves from anaplasmosis-infected dams. **Am. J. Vet. Res.**, v.23, p.1007-1010, 1962.

Kuttler, K.L.. Anaplasma infections in wilds and domestics ruminants: a review. **J. Wildlife dis.**v.20, p.12-20, 1984.

Madruga, C.R.; Marques, A.P.C.; Leal, C.R.B.; Carvalho, C.M.E.; Araújo, F.R.; Kessler, R.H.. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. **Pesq. Vet. Bras.**, v.20, p.109 -112, 2000.

Madruga, C.R.; Araújo, F.R.; Soares, C.O.. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande, Embrapa Gado de Corte, 360p, 2001.

Moulton, J.E.; Cristensen, J.F.. The histochemical nature of *Anaplasma marginale*. **Am. J. Vet. Res.**, v.16, p.377-380, 1953.

Norton, J.M.; Parker, R.J.; Forbes-Faulkner, J.C.. Neonatal anaplasmosis in a calf. **Aust.Vet J.**, v.60,p.348, 1983.

Paine, G.D.; Miller, A.S.. Anaplasmosis in a newborn calf. **Vet. Rec.**, v.100, p.58, 1977.

Passos, L.M.F.; Lima, J.D.. Diagnóstico de anaplasnose bovina congênita em Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 36,p.243-244, 1984.

Potgieter, F.T.; Van Rensburg, L.. The persistence of colostral *Anaplasma marginale* antibodies and incidence of *in utero* transmission of *Anaplasma marginale* infections in calves under laboratory conditions. **Onderstepoort J.Vet. Res.**, v. 54,p. 557-560, 1987.

Rees, C.W.. Experimental transmission of bovine anaplasmosis and piroplasmiasis by means of infected lancet. **North Am. Vet.**, v.11,p.17-20, 1930.

Rehman, W.C.. **Doenças do Gado Leiteiro**. Ed. Roca, São Paulo, 2000.

Ribeiro, M.F.B.; Lima, J.D.; Guimarães, A.M.; Scatamburlo, M.A.; Martins, N.E.. Transmissão congênita da anaplasmosse bovina, **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v.47,p.297-304, 1995.

Ristic, M.. Anaplasmosis, **Adv. Vet. Sci.**, v.7, p.111-192, 1960.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.. Molecular cloning: A laboratory manual, 2<sup>nd</sup>. Ed. **Cold Spring Harbour Laboratory Press**. New York, 1989.

Silva, G.A.C. *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910): **Imunidade passiva e ativa em bovinos nascidos na primavera no sul do Rio Grande do Sul**. Pelotas, 2003. 33 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária – Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Veterinária. UFPel, 2003.

Smith, R.D.. **Veterinary Clinical Epidemiology, a problem-oriented approach**. 2<sup>o</sup> ed. CCR Press, 279 p., 1995.

Simpson, Ch.F.; Kling, J.M.; Love, J.N.. Morphological and histochemical nature of *Anaplasma marginale*. **Am. J. Vet. Res.**, v.28, p.1055-1065, 1967.

Soares, C.O.. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. In Madruga, C.R.; Araújo, F.R.; Soares, C.O.. (ed), **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, p.145-175, 2001.

Souza, J.C.P.; Soares, C.O.; Massard, C.L.; Scotfield, A.; Fonseca, A.H.. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesq. Vet. Bras.** v.20, n.3, Rio de Janeiro, July/Sept. 2000.

Stiller, D.. Biotechnology: a new approach to the diagnosis and control of tick-borne diseases. **Annals of New York Academic Sciences**, v.683, p.19-25, 1992.

Stiller, D.; Coan, M.E.. Recent developments in elucidating tick vector relationship for anaplasmosis and equine piroplasmiasis, **Vet. Parasitol.**, v.57, p.97-108, 1995.

Swift, B.L.; Paumer, R.J.. Vertical transmission of *Anaplasma marginale* in cattle. **Theriogenology**. v.10, p.515-519, 1976.

Swift, B.L.; Settlemire, J.J.; Thoms, G.M.. Inoculation of pregnant beef heifers at midgestation with *Anaplasma marginale*. **Theriogenology**, v.10, p.481-485, 1978.

Torioni De Echaide, S.; Knowles, D.P.; McGuire, T.C.; Palmer, G.H.; Suárez, C.E.; McElwain, T.F.. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.777-782, 1998.

Trueblood, M.S.; Swift, B.L.; Bear, P.D.. Bovine fetal response to *Anaplasma marginale*. **American Journal of Veterinary Research**, v.32, n.7, p.1089-1090, 1971.

Uilemberg, G.. Notes sur les babesioses et l'anaplasmose des bovins à Madagascar. I. Introduction – Transmission. **Rev. Élev. Méd. Vét. Pays Trop.**, v.21, p. 467-474, 1968.

Wandera, J.G.; Munyua, W.K.. Severe anaplasmosis in a 4-Day-Old calf. **Bull. Epizoot. Dis, Afr.** v.19, p.219-221, 1971.

Zaugg, J.L.; Kuttler, K.L.. Bovine anaplasmosis *in utero* transmission and the immunologic significance of ingested colostrum antibodies. **Am. J. Vet. Res.**, v.45, p.440-443, 1984.

Zaugg, J.L.. Bovine anaplasmosis: Transplacental transmission as it relates to stage of gestation. **Am.J. Vet. Res.**, v.46, p.570-572, 1985

## ANEXO I

### CÁLCULO DA PORCENTAGEM DE CONCORDÂNCIA

Segundo Coggon et al. (1993)

**TECNICAS  
RIFI**

**ELISA I.**

	POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	a	b	a + b
NEGATIVO	c	d	c + d
TOTAL	a+c	b+d	a + b + c + d

Concordantes positivos = a

Concordantes negativos = d

Ñ concordantes = b+c sendo b falsos negativos e d falsos positivos

Índice de co-positividade =  $a / a+b$

Índice de co-negatividade =  $d / c+d$

% de Concordância =  $a+d / a+b+c+d$

$a+b+c$  = total de soros testados que foram positivos em ambos os testes, ou ao menos em um dos testes.

## ANEXO II

### CALCULO DO ÍNDICE KAPPA

Segundo Smith ( 1995 )

	POSITIVO	NEGATIVO
POSITIVO	a	b
NEGATIVO	c	d

$$\text{Concordância observada} = \frac{a + d}{a + b + c + d} = \frac{(\text{observação a}) + (\text{observação d})}{a + b + c + d} = \text{--\%}$$

$$\text{Probabilidade de concordância para a célula a} = \frac{(a + b) \times (a + c)}{a + b + c + d} = \text{-----}$$

$$\text{Probabilidade de concordância para a célula b} = \frac{(c + d) \times (b + d)}{a + b + c + d} = \text{-----}$$

$$\text{Probabilidade de concordância completa} = \frac{(\text{probabilidade a}) + (\text{probabilidade b})}{a + b + c + d} = \text{--\%}$$

$$\text{KAPPA} = \frac{\text{Concordância observada} - \text{Probabilidade de concordância completa}}{100 \% - \text{Probabilidade de concordância completa}} =$$

Resultados:

0,0 = rara probabilidade de concordância.

0,0 – 0,2 = fraca

0,2 – 0,4 = regular

0,4 – 0,6 = moderada

0,6 – 0,8 = substancial

0,8 – 1,0 = concordância quase perfeita entre os testes

+ 1,0 = concordância perfeita

### ANEXO III

**Tabela de resultados dos testes laboratoriais das matrizes, terneiros ao nascer e aos 3 dias do nascimento.**

Vacas	PCR	RIFI	ELISA	T. nasc.	PCR	RIFI	ELISA	T.+3d.	RIFI
01	-	+	+	01	-	-	-	01	+
02	+	+	+	02	+	+	-	02	+
03	+	+	+	03	-	-	-	03	+
04	-	+	+	04	-	-	-	04	+
05	-	+	+	05	-	-	-	05	+
06	+	+	+	06	-	-	-	06	+
07	+	+	+	07	-	-	-	07	+
08	+	+	+	08	-	-	-	08	+
09	-	+	+	09	-	-	-	09	+
10	+	+	+	10	-	-	-	10	+
11	+	+	+	11	-	-	-	11	+
12	+	+	+	12	-	-	-	12	+
13	+	+	+	13	+	+	-	13	+
14	+	+	+	14	-	-	-	14	+
15	-	+	+	15	-	-	-	15	+
16	+	+	+	16	-	-	-	16	+
17	+	+	-	17	-	-	-	17	+
18	+	+	+	18	-	-	-	18	+
19	+	+	+	19	-	-	-	19	+
20	+	+	+	20	-	-	-	20	+
21	+	+	+	21	-	-	-	21	+
22	+	+	+	22	-	-	-	22	+
23	-	+	+	23	-	-	-	23	+
24	+	+	+	24	-	-	-	24	+
25	-	+	+	25	-	-	-	25	+
26	+	+	+	26	-	-	-	26	+
27	-	+	+	27	-	-	-	27	+
28	-	+	+	28	-	-	-	28	+
29	-	+	+	29	-	+	-	29	+
30	-	+	+	30	-	-	-	30	+

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)