

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA RIBOFLAVINA ASSOCIADA À
RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INATIVAÇÃO DO
Anaplasma marginale EM SANGUE BOVINO CONSERVADO
PARA TRANSFUSÃO E ESTUDO DAS ALTERAÇÕES
HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DURANTE O PERÍODO DE
ESTOCAGEM.**

LEIZINARA GONÇALVES LOPES

Botucatu – SP
Março de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA RIBOFLAVINA ASSOCIADA À
RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INATIVAÇÃO DO
Anaplasma marginale EM SANGUE BOVINO CONSERVADO
PARA TRANSFUSÃO E ESTUDO DAS ALTERAÇÕES
HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DURANTE O PERÍODO DE
ESTOCAGEM.**

LEIZINARA GONÇALVES LOPES

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Livre-docente Raimundo Souza Lopes
Co-orientador: Dr. Pedro Paulo Pires

Botucatu – SP
Março de 2011

Nome do Autor: Leizinara Gonçalves Lopes

Título: AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA RIBOFLAVINA ASSOCIADA À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INATIVAÇÃO DO *Anaplasma marginale* EM SANGUE BOVINO CONSERVADO PARA TRANSFUSÃO E ESTUDO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DURANTE O PERÍODO DE ESTOCAGEM.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Profa.Dra. Regina Kiomi Takahira

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Cecília Braga Laposy

Membro

Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Data da defesa: 28 de março de 2011.

COMISSÃO DE ÉTICA

Protocolo n° 97/2009 – CEUA

O Projeto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Anexo 5).

“O sonho de atender os animais encoraja ao trabalho árduo.”

Pedro Paulo Pires

DEDICATÓRIA

**Para meus pais e irmão,
Pela amizade, afeto, amor e carinho.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que com sua infinita bondade e sabedoria guiou-me em todos os momentos, e colocou pessoas tão especiais no meu caminho.

Agradeço aos meus pais, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que iluminaram os caminhos obscuros, que me dedicaram amor, afeto e carinho, que se doaram inteiros para que eu pudesse realizar os meus sonhos, pela espera e compreensão durante minhas longas viagens. A vocês, meus pais, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que acontece agora, quando procuro uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Amo vocês!

Ao meu irmão, pela amizade e companherismo.

Ao Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes e ao Dr. Pedro Paulo Pires pela amizade, orientação, confiança, paciência, ensinamentos e estímulos para realização deste trabalho.

Aos meus avós e todos os meus familiares, que mesmo distantes, são fundamentais em minha vida.

Aos meus amigos pela ajuda, aos momentos inesquecíveis e apoio nas dificuldades.

Ao Dr. Flávio Ribeiro Araújo e ao Doutorando Carlos Ramos, da EMBRAPA – Gado de Corte, pela doação dos inóculos e auxílio nos exames de Reação em Cadeia da Polimerase.

Ao Dr. Leucio Câmara Alves, professor da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE - PE, que tão prontamente nos auxiliou no exames de Reação de Imunofluorescência Indireta.

Ao Prof. João Pessoa de Araújo Junior e ao Dr. Flávio Paz do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu – SP, pelo auxílio nos exames de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa.

Aos funcionários do Laboratório Clínico Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Mácio José Figueira, Ilson A. Tavares e Luiz Antônio Matiazzi, pela amizade, incentivo e pelo auxílio nas dosagens bioquímicas.

A Médica Veterinária Silvia Regina Vinholi do Laboratório Pet Lab de Campo Grande – MS, pela disponibilização do seus equipamentos laboratoriais para realização das análises deste trabalho.

Aos funcionários e amigos da EMBRAPA – Gado de Corte, pelo carinho, convívio, amizade, ensinamentos e ajuda. É uma alegria trabalhar com pessoas tão especiais.

Obrigado a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Gado de Corte (EMBRAPA – Gado de Corte) pelo apoio e execução do experimento.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para realização deste projeto de pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Valores de referência normais do Laboratório Clínico Veterinário “Profa. Dra. Aguemi Kohayagawa”.....	20
TABELA 2 -	Valores de referência normais para Bioquímica do Laboratório Clínico Veterinário “Profa. Dra. Aguemi Kohayagawa”.....	20
TABELA 3 -	Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores da Contagem Total de Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (<i>Anaplasma marginale</i>). Botucatu - SP, 2011.....	28
TABELA 4 -	Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores da Concentração de Hemoglobina (g/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (<i>Anaplasma marginale</i>). Botucatu - SP, 2011.....	30
TABELA 5 -	Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores do Volume Globular (%) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (<i>Anaplasma marginale</i>). Botucatu - SP, 2011.....	32

TABELA 6 -	Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores do Volume Corpuscular Médio (fL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (<i>Anaplasma marginale</i>). Botucatu - SP, 2011.....	34
TABELA 7 -	Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores de Proteína Plasmática Total (g/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (<i>Anaplasma marginale</i>). Botucatu - SP, 2011.....	36
TABELA 8 -	Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores de Fibrinogênio Plasmático (mg/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (<i>Anaplasma marginale</i>). Botucatu - SP, 2011.....	37
TABELA 9 -	Médias $\pm$ Desvios-padrão da Contagem Total de Leucócitos (μ L) de bezerros mestiços Nelore / Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (<i>Anaplasma marginale</i>). Botucatu - SP, 2011.....	39

TABELA 10 -	Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores da Concentração de Sódio Plasmático (mmol/L) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (<i>Anaplasma marginale</i>). Botucatu - SP, 2011.....	40
TABELA 11 -	Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores da Concentração de Potássio Plasmático (mmol/L) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (<i>Anaplasma marginale</i>). Botucatu - SP, 2011.....	42
TABELA 12 -	Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores do Teor de Lactato Plasmático (mg/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (<i>Anaplasma marginale</i>). Botucatu - SP, 2011.....	43
TABELA 13 -	Valores de Temperatura Corpórea (T °C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal III.A (Esplenectomizado, recebeu sangue não tratado com Riboflavina e radiação ultravioleta, positivo para RIFI e qPCR). Botucatu – SP,	

2011.....	47
TABELA 14 - Valores de Temperatura Corpórea (T °C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal III.B (Esplenectomizado, recebeu sangue não tratado com Riboflavina e radiação ultravioleta, RIFI negativo e qPCR positivo). Botucatu – SP, 2011.....	47
TABELA 15 - Valores de Temperatura Corpórea (T °C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal IV.A (Hígido, recebeu sangue tratado com Riboflavina e radiação ultravioleta). Botucatu – SP, 2011.....	48
TABELA 16 - Valores de Temperatura Corpórea (T °C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal IV.B (Hígido, recebeu sangue tratado com Riboflavina e radiação ultravioleta). Botucatu – SP, 2011.....	49

TABELA 17 -	Valores de Temperatura Corpórea (T °C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal IV.C (Hígido, recebeu sangue tratado com Riboflavina e radiação ultravioleta). Botucatu – SP, 2011.....	50
TABELA 18 -	Valores de Temperatura Corpórea (T °C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal V.A (Esplenectomizado, recebeu sangue tratado com Riboflavina e radiação ultravioleta). Botucatu - SP, 2011.....	51
TABELA 19 -	Valores de Temperatura Corpórea (T °C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal V.B (Esplenectomizado, recebeu sangue tratado com Riboflavina e radiação ultravioleta). Botucatu - SP, 2011.....	51

TABELA 20 -	Valores de Temperatura Corpórea (T °C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal V.C (Esplenectomizado, recebeu sangue tratado com Riboflavina e radiação ultravioleta). Botucatu - SP, 2011.....	52
--------------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Animais mestiços Nelore/Caracu durante manejo para seleção.....	17
FIGURA 2 -	Tratamento do sangue parasitado com <i>Anaplasma marginale</i> no momento da tentativa de inativação com Riboflavina associado à radiação ultravioleta.....	21
FIGURA 3 -	Valores médios da Contagem Total de Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (<i>Anaplasma marginale</i>). Botucatu -SP, 2011.....	29
FIGURA 4 -	Valores médios da Concentração de Hemoglobina (g/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (<i>Anaplasma marginale</i>). Botucatu - SP, 2011.....	31
FIGURA 5 -	Valores médios do Volume Globular (%) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (<i>Anaplasma marginale</i>). Botucatu - SP, 2011.....	32

- FIGURA 6 -** Valores médios do Volume Corpuscular Médio (fL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011..... 35
- FIGURA 7 -** Valores médios de Proteína Plasmática Total (g/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011..... 36
- FIGURA 8 -** Valores médios de Fibrinogênio Plasmático (mg/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011..... 38
- FIGURA 9 -** Valores médios da Contagem Total de Leucócitos (μ L) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011..... 39

- FIGURA 10 -** Valores médios da Concentração de Sódio Plasmático (mmol/L) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011..... 41
- FIGURA 11 -** Valores da Concentração de Potássio plasmático (mmol/L) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011..... 42
- FIGURA 12 -** Valores médios do Teor de Lactato Plasmático (mg/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011..... 44

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	Momentos de análise laboratorial da primeira fase experimental em bolsa plástica.....	22
QUADRO 2 -	Momentos de análise laboratorial da segunda fase experimental nos bezerros a serem testados.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD	Ácido Citrato Dextrose
CPD	Citrato Fosfato Dextrose
CPDA-1	Citrato Fosfato Dextrose Adenina
ATP	Adenosina Tri-fosfato
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
RNA	Ácido Ribonucleico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana adquirida
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
ESC	Esfregaço Sanguíneo Corado
TBP	Tristeza Parasitária Bovina
UV	Radiação Ultravioleta
He	Contagem do Número Total de Hemácias
Hb	Concentração de Hemoglobinas
VG	Concentração do Volume Globular
VCM	Volume Corpuscular Médio
PPT	Determinação de Proteína Plasmática Total

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Transfusão sanguínea e transmissão de agentes patogênicos...	04
2.2. Conservação de sangue.....	05
2.3. Riscos associados à Transfusão.....	08
2.3.1. Anaplasmoses.....	08
2.4. Técnicas de Inativação.....	13
2.4.1. Inativação de plasma, plaquetas, sangue total e células vermelhas.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Local da pesquisa.....	16
3.2. Animais utilizados.....	16
3.3. Manejo dos animais.....	17
3.4. Esplenectomia.....	18
3.5. Pós-operatório.....	19
3.6. Colheita das amostras.....	19
3.7. Etapas e grupos experimentais.....	19
3.7.1. Primeira etapa experimental.....	19
3.7.2. Segunda etapa experimental.....	20
3.7.3. Redução de patógenos através de tratamento com Riboflavina associada à radiação ultravioleta.....	22
3.8. Momentos das avaliações laboratoriais.....	22
3.9. Avaliação laboratorial.....	23
3.9.1. Primeira etapa experimental.....	23
3.9.1.1. Hemograma.....	23
3.9.1.2. Bioquímica.....	24
3.9.2. Segunda etapa experimental.....	24
3.9.2.1. Inoculação em bezerros esplenectomizados.....	24
3.9.2.2. Pesquisa de hematozoários.....	25
3.9.2.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	25

3.9.2.4. Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa (qPCR).....	26
3.10. Recuperação terapêutica dos animais infectados.....	27
3.11. Análise Estatística.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Primeira etapa experimental.....	28
4.1.1. Contagem Total de Hemácias.....	28
4.1.2. Concentração de Hemoglobina.....	29
4.1.3. Concentração do Volume Globular.....	31
4.1.4. Volume Corpuscular Médio (VCM).....	33
4.1.5. Proteína Plasmática Total.....	35
4.1.6. Fibrinogênio.....	37
4.1.7. Contagem Total de Leucócitos.....	38
4.1.8. Concentração de Sódio Plasmático.....	40
4.1.9. Concentração de Potássio Plasmático.....	41
4.1.10. Concentração de Lactato Plasmático.....	43
4.2. Segunda etapa experimental.....	45
4.2.1. Técnicas utilizadas para análise da segunda etapa experimental.....	45
4.2.1.1. Esfregaço Sanguíneo Corado (ESC).....	45
4.2.1.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	45
4.2.1.3. Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR).....	46
4.2.2. Análise descritiva dos resultados obtidos durante a segunda etapa experimental.....	46
5. CONCLUSÕES.....	54
5.1. Primeira Etapa Experimental.....	54
5.2. Segunda Etapa Experimental.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
7. ANEXOS.....	68
8. TRABALHO CIENTÍFICO (Pesquisa Veterinária Brasileira, enviado dia 01/03/2011).....	77

LOPES, L.G. **AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA RIBOFLAVINA ASSOCIADA À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA INATIVAÇÃO DO *Anaplasma marginale* EM SANGUE BOVINO CONSERVADO PARA TRANSFUSÃO E ESTUDO DAS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DURANTE O PERÍODO DE ESTOCAGEM.** Botucatu, 2011. 86p. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O estudo teve como objetivo verificar possíveis alterações hematológicas e bioquímicas que ocorrem no sangue bovino de animais hígidos e parasitados com *Anaplasma marginale*, conservado por 21 dias em bolsas plásticas contendo Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina (CPDA-1) e avaliar a ação da Riboflavina associada à radiação ultravioleta (UV) na inativação do hemoparasita. Na primeira etapa foram determinados o número de Hemácias (He) e Leucócitos, Hemoglobina (Hb), Volume Globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Proteína Plasmática Total (PPT), Fibrinogênio, Sódio (Na⁺), Potássio (K⁺) e Lactato, a cada três dias, durante 21 dias, do grupo I formado por bolsas contendo sangue de bovinos saudáveis e do grupo II, por bolsas com sangue parasitado por *A. marginale*. Na segunda, foram realizados os exames do Esfregaço Sanguíneo Corado (ESC), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) antes e após o tratamento com Riboflavina associada à radiação UV, além da inoculação em bezerros para verificar se o parasita mantinha sua infectividade. Estes exames foram repetidos *in vivo* nos dias sete, 14 e 21 após a inoculação. Na primeira etapa, para ambos os grupos, ocorreu redução dos valores de He, Hb, VG, PPT, Leucócitos e Na⁺; e aumento no VCM, K⁺ e Lactato. Na segunda etapa, ocorreu redução da carga parasitária de 30,60% no momento zero (M0) para 15,26% após o tratamento; RIFI de 100% positivo no M0, para 100% negativo após o tratamento. A qPCR demonstrou que o tratamento não promoveu completa eliminação do parasita, mas houve uma inativação parcial, já que os bezerros receptores não adoeceram.

Palavras-chave: *Anaplasma marginale*; Bezerros; Radiação ultravioleta; Riboflavina; Transfusão sanguínea.

LOPES, L.G. **EVALUATION OF THE ACTION OF RIBOFLAVIN ASSOCIATED WITH ULTRAVIOLET RADIATION ON THE INACTIVATION OF *Anaplasma marginale* IN BOVINE BLOOD KEPT FOR TRANSFUSION AND STUDY OF BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL CHANGES DURING THE STORAGE PERIOD.** Botucatu, 2011. 86p. Thesis – Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics at Julio de Mesquita Filho São Paulo State University, UNESP, São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate hematological and biochemical changes in bovine blood from healthy and *Anaplasma marginale* infected animals after a 21day storage period in plastic bags with Citrate-Phosphate-Dextrose-Adenine (CPDA-1) and also to evaluate the effect of Riboflavin associated with ultraviolet radiation (UV) on the inactivation of the hemoparasite. In the first experimental phase, the number of Erythrocytes (RBC) and Leukocytes, Hemoglobin (Hb), Globular Volume (GV), Mean Corpuscular Volume (MCV), Total Plasma Protein (TPP), Fibrinogen, Sodium (Na⁺), Potassium (K⁺) and Lactate was determined every 3 days for 21 days in blood stored in plastic bags from clinically healthy animals (Group I) and in blood stored in plastic bags containing blood from infected animals by *Anaplasma marginale* (Group II). In the second experimental phase, stained blood smears, indirect immunofluorescence assay (IFA) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were performed before and after the treatment with riboflavin associated with UV radiation. Also, calves were inoculated to evaluate the infectivity of the parasite. These exams were repeated at day 7, 14 and 21 after inoculation. In the first phase a reduction in RBC, Hb, GV, TPP, Leukocytes and Na⁺ and an increase in MCV, K⁺ and Lactate were observed in both groups. In the second phase, the parasite load of 30.60% at time zero (T0) was reduced to 15.26% after the treatment; IFA of 100% positive at T0 was reduced to 100% negative after the treatment. qPCR revealed that total elimination of the parasite by the treatment was not observed but there was a partial inactivation was observed since the recipient calves did not get sick.

Key-words: *Anaplasma marginale*, calves, Ultraviolet radiation, Riboflavin and blood transfusion.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Desde os primeiros relatos de transfusões sangüíneas no século XVII, a medicina transfusional tem evoluído muito. Hoje as indicações para a transfusão de sangue total ou de um de seus componentes, são a necessidade do restabelecimento da capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, deficiências na hemostasia, transferência de imunidade passiva e hipoproteïnemia e/ou hipovolemia (LANEVSKI e WARDROP, 2001; REICHMANN e DEARO, 2001; CARTANA, 2010)

Assim, é muito importante a adequada conservação do sangue e seus derivados utilizados na transfusão sanguínea. Pelos benefícios que o procedimento terapêutico proporciona tudo deve ser feito objetivando que a transfusão sanguínea não funcione como agente facilitador da transmissão de agentes patogênicos (REICHMANN e DEARO, 2001).

Com emprego adequado da transfusão sanguínea pode-se melhorar a taxa de sobrevivência e recuperação de animais enfermos (BETTS e CRANE, 1988).

Existe um risco muito elevado de transmissão de agentes infecciosos, devido ao longo período de incubação e persistência subclínica em animais infectados, existindo assim a probabilidade destes permanecerem viáveis no sangue estocado (FREITAS et al., 2006).

Os riscos associados com a transfusão de sangue incluem a possibilidade de transmissão de doenças através do sangue, como por exemplo, a anaplasmosse e babesiose (FELDMAN et al., 2000).

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é uma parasitose provocada por uma rickettsia, *Anaplasma marginale* e pelos protozoários do gênero *Babesia* (*B. bovis* e *B. bigemina*), (KESSLER et al., 1998). O impacto econômico da TPB no Brasil é devido aos gastos com tratamento, a mortalidade e perdas indiretas como queda na produção de leite, diminuição do ganho de peso e custos de controle e profilaxia, que são estimados entre 500 milhões e dois bilhões de dólares (KESSLER, et al., 2001; ALMEIDA et al., 2006).

A rickettsia, *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910), é um organismo intraeritrócitário atualmente classificado como pertencente ao grupo das Ehrlichias (WALKER e DUMLER, 1996). É considerada a quarta

hemoparasitose mundial em importância econômica e tem impedido o desenvolvimento pecuário em diversas regiões (UILENBERG, 1995).

O parasitismo intraeritrócitário dessa rickettsia é responsável pelo comprometimento da produção, por provocar anemia. A rickettsemia resultante pode comprometer de 10 a 90% dos eritrócitos circulantes, e há a probabilidade de ocorrer até 34% de mortalidade nos surtos de rebanhos bovinos não imunes a *A. marginale* (KESSLER et al., 1998).

Os métodos imunoproláticos mais frequentemente utilizados no controle e prevenção da anaplasmoze bovina incluem a utilização de vacinas atenuadas ou não, ou vacinas do tipo heterólogas com *Anaplasma centrale*, espécie não patogênica, mas que confere proteção cruzada (PATARROYO, 1992; VIDOTTO et al., 1995; VIDOTTO et al., 1998). Além da vacinação, a quimioprevenção com tetraciclina de longa duração (ROGERS e DUNSTER, 1984) e o controle estratégico de vetores ou a erradicação dos mesmos podem ser medidas úteis (OLIVEIRA, 1993).

Como existe a possibilidade de transmissão de doenças infecciosas, como a anaplasmoze, através da transfusão sanguínea (FREITAS et al., 2006), cresce a importância das tentativas de inativação de patógenos em bolsas para transfusão.

As técnicas já utilizadas para inativação de patógenos promovem uma maior segurança na hemoterapia reduzindo as chances de contaminação de animais receptores (SOLLHEIM e SEGATCHIAN, 2006).

As mais promissoras abordagens para inativação, até agora, são métodos que têm por alvo o impedimento da replicação do patógeno no genoma. Um exemplo é o tratamento com Riboflavina associada à radiação ultravioleta (UV). Estudos *in vitro* foram realizados para garantir a sua segurança em termos de toxicidade para as células e/ou para os pacientes (SEGATCHIAN e DE SOUSA, 2006).

A Riboflavina, vitamina B2, é uma molécula capaz de fazer a intercalação e a oxidação do DNA e RNA na presença de radiação ultravioleta (KUMAR, 2004). Isto sugere que ela poderia agir como um fotossensibilizador útil para a inativação de agentes patogênicos encontrados em produtos do sangue (CORBIN, 2002).

Existem poucas informações na literatura sobre a inativação de patógenos intraeritrócitário por meio de tratamento com Riboflavina associada à radiação ultravioleta, além da necessidade de estudos *in vivo*, que permitam a avaliação da eficácia deste tratamento.

Este estudo teve como objetivos:

1. Verificar as alterações hematológicas e bioquímicas que ocorrem no sangue bovino de animais saudáveis, comparando com as alterações do sangue de animais parasitados com *Anaplasma marginale* quando conservado em bolsas plásticas contendo CDPA-1, de 1 a 4 °C por 21 dias.
2. Avaliar a ação da Riboflavina associada à radiação ultravioleta, na tentativa de inativação, redução ou completa eliminação do *Anaplasma marginale* em sangue bovino conservado para transfusão.
3. Verificar se o sangue parasitado estocado por 21 dias e tratado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta não causou doença nos animais receptores.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Transfusão sanguínea e transmissão de agentes patogênicos

A transfusão sanguínea vem sendo utilizada na medicina humana desde o século XVII, porém o grande avanço na hemoterapia ocorreu somente no século XX com o advento dos anticoagulantes e das substâncias conservantes. Pelos benefícios que o procedimento terapêutico proporciona tudo deve ser feito objetivando que a transfusão sanguínea não funcione como agente facilitador da transmissão de agentes patogênicos. Assim, é muito importante a adequada conservação do sangue e seus derivados utilizados na transfusão sanguínea (REICHMANN e DEARO, 2001).

Com emprego adequado da transfusão sanguínea pode-se melhorar a taxa de sobrevivência e recuperação de animais enfermos (BETTS e CRANE, 1988). As indicações para a transfusão de sangue são: a necessidade do restabelecimento da capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, deficiências na hemostasia, transferência de imunidade passiva e hipoproteïnemia e/ou hipovolemia (REICHMANN e DEARO, 2001). Em casos de anemia pode ser necessária a transfusão de sangue como parte da terapia, por exemplo, na anaplasmoze, alguns clostrídios, em alguns casos de envenenamento, leptospirose, e causas idiopáticas (DIVERS, 2005).

A transmissão de doenças infecciosas através da transfusão sanguínea é bem documentada em medicina veterinária. A triagem dos doadores para as principais enfermidades que podem ser veiculadas pelo sangue é de extrema importância para não piorar ainda mais a condição clínica do receptor. Existe um risco muito elevado de transmissão de agentes infecciosos, devido ao longo período de incubação e persistência subclínica em animais infectados, existindo assim a probabilidade destes permanecerem viáveis no sangue estocado (FREITAS et al., 2006).

Os ruminantes têm um número variado de grupos sanguíneos (bovinos pelo menos 13, ovinos sete a oito, caprinos pelo menos cinco). Independente do número de diferentes grupos sanguíneos em ruminantes, estes não possuem ou possuem poucas hemolisinas circulantes naturalmente e, portanto uma primeira transfusão pode ser realizada com riscos menores de ocorrerem

reações transfusionais adversas fatais (REICHMANN e DEARO, 2001). Os sinais de reações adversas provenientes da transfusão de sangue total ou plasma em bovinos são taquicardia, taquipnéia, tremores musculares, prurido, salivação, tosse, dispnéia, febre, lacrimejamento, hematúria, hemoglobinúria, colapso, apnéia, e opstótono.

Antes de cada doação, o histórico do doador deve ser averiguado, submetendo-o a um exame físico e laboratorial, além disso o animal não deve estar sob tratamento, nem ter histórico de doença grave ou contato com carrapatos e outros vetores de doenças, não deve ter recebido transfusão sanguínea recente e, as fêmeas não devem estar gestantes (LACERDA, 2005).

2.2. Conservação de sangue

Segundo Lanevski e Wardrop (2001), a heparina e o citrato são anticoagulantes que não contribuem para a conservação das hemácias durante um armazenamento em longo prazo e o sangue total coletado com esses anticoagulantes deve ser utilizado dentro de 24 horas. Os conservantes mais comumente utilizados são o Ácido Citrato Dextrose (ACD), Citrato Fosfato Dextrose (CPD e CPD-2) e o Citrato Fosfato Dextrose Adenina (CPDA-1), no qual é adicionado dextrose, fosfato e adenina para favorecer a viabilidade das hemácias, permitindo seu armazenamento por três a cinco semanas, dependendo do conservante utilizado.

Betts e Crane (1988) defendem que em medicina veterinária as hemácias apresentam uma viabilidade aceitável de 24 horas após a transfusão, se armazenadas com o conservante do tipo CPD por 21 dias demonstram uma viabilidade aceitável de 80%, e quando conservadas com o CPDA-1 por 35 dias, com viabilidade de 79%. Em geral não se utiliza sangue total armazenado por mais de três semanas (KIRK e BISTNER, 1987).

O estudo realizado por Ribeiro Filho et al. (1992), com bovinos, utilizando recipientes e conservantes diferentes, como bolsas plásticas contendo CPDA-1 e tubos de vidro contendo ACD, concluiu que o sangue bovino total pode ser satisfatoriamente conservado em frascos de vidro contendo ACD por 14 dias, e no máximo por 21 dias. Em bolsas plásticas com CPDA-1, conserva satisfatoriamente por 28 dias, e no máximo por 35 dias.

Wardrop et al. (1994) e Souza (2009) avaliaram o período de viabilidade das hemácias quando conservadas em solução salina, adenina, dextrose e manitol, defendendo que seriam viáveis por um período de até 37 dias.

A armazenagem de concentrados de hemácias para o uso clínico em bancos de sangue é limitado pelas perdas na integridade e função das células em decorrência da idade. Uma das principais razões que prejudica a qualidade das bolsas de sangue é a redução da capacidade das células de combater a auto-oxidação durante o armazenamento (GEISE, 1999).

Em bancos de sangue é comum a conservação de hemácias por 35 a 42 dias, a 4°C com uma viabilidade aceitável de 24 horas após a transfusão. Entretanto, ocorrem deteriorações na morfologia das hemácias durante o período de estocagem. As mudanças morfológicas são geralmente associadas à redução da deformabilidade dos eritrócitos (GODINE e CAPRANI, 1997; SOUZA, 2009).

A manutenção da deformabilidade normal da hemácia é essencial para o processo de entrega do oxigênio da hemácia para os tecidos. A deformação inadequada da hemácia pode levar a hemólise por esta célula se tornar muito frágil, ou caso a hemácia se torne muito rígida, ela pode causar uma oclusão capilar, não desempenhando assim sua função (FISHER, 2004).

Segundo Almosny et al. (2000), quando a concentração de adenosina trifosfato (ATP) dentro da hemácia diminui para 20% do valor normal, ocorre saída de potássio e entrada de sódio na hemácia, fazendo com que essa célula se torne cilíndrica e, com isto, sejam retirados da circulação sanguínea e serão fagocitadas pelo sistema fagocítico mononuclear.

O sangue bovino conservado em ACD por 21 dias apresenta diminuição do número de eritrócitos devido a hemólise. Demonstra também aumento do Volume Corpuscular Médio (VCM) ao sétimo dia de conservação, sendo observada uma redução posterior desses valores. Isso ocorre devido ao desequilíbrio osmótico eritrocitário (RIBEIRO FILHO et al., 1992).

No estudo com sangue canino conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 apresenta um aumento progressivo no VCM, ocasionado pelo acúmulo de lactato (PRINCE, 1988 *apud* RIBEIRO FILHO et al., 1992). Situação semelhante foi relatada por Souza (2009), em estudo com sangue de

ovinos conservados com CPDA-1, onde foi verificado um aumento progressivo do VCM e redução do número de hemácias após 21 dias de conservação.

De acordo com Salib e Dawson (1985), uma enzima muito semelhante a quimiotripsina isolada em leucócitos humanos, possui uma importante ação hemolítica. Esta proteína é liberada na ocasião da lise do leucócito. Assim a preservação dessas células é importante para minimizar a hemólise durante o período de estocagem do sangue destinado a transfusão. A degeneração dos neutrófilos pode liberar proteases, ocasionando lesões na membrana dos eritrócitos, gerando uma população de hemácias mais frágeis. Também notaram a diminuição do número de leucócitos durante o período de conservação pela degranulação dos polimorfonucleares, que degeneram mais rapidamente que os linfócitos. Em experimento com sangue de búfalo armazenado em bolsas contendo CPD e ACD apresentaram redução dos números de leucócitos totais, principalmente neutrófilos com o decorrer do tempo.

Apesar da diminuição do número de leucócitos, estas células podem estar em números aparentemente elevados pela presença de crioglobulinas, criofibrinogênio, plaquetas acumuladas e fibrinas da coagulação, quando contados utilizando contadores de células automáticos. Apenas 3% dos neutrófilos armazenados por 72 horas em bolsas plásticas com CPDA-1 apresentam morfologia normal (RIBEIRO FILHO et al., 1992).

Pode existir uma desnaturação protéica em sangue estocado, que ocorre provavelmente devido ao pH ácido do meio onde esse sangue é armazenado (RIBEIRO FILHO et al., 1992). Souza et al. (2009), trabalhando com sangue de ovino conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, observou que a diminuição do pH sanguíneo promove lesões na membrana eritrocitária e desnaturação protéica levando a redução das proteínas plasmáticas.

De acordo com Costa Júnior (2006), com a retirada do sangue da circulação, o metabolismo das células gera uma redução do pH, principalmente devido a metabolização da glicose pela via glicolítica anaeróbica que resulta na formação de lactato levando a um acúmulo de íons de hidrogênio. O pH do sangue é altamente dependente da temperatura, ou seja, a temperatura de

37°C a produção de lactato é duas vezes maior que a 20°C e três vezes maior que a 15°C.

O sangue conservado em bolsas com CPD apresenta elevação do potássio sérico, que é decorrente da solução preservadora, do tempo de conservação, da redução da atividade da enzima de sódio/potássio ATPase, da temperatura de estocagem e da hemólise que ocorre durante o período de armazenamento (MICHAEL, 1975).

A redução da atividade da enzima sódio/potássio ATPase promove o acúmulo de sódio intracitoplasmático e de potássio no meio extracelular. Esta alteração foi verificada em estudo onde foram utilizados sangue de diferentes espécies (MICHAEL, 1975; COSTA JÚNIOR, 2006; SOUZA et al., 2009).

2.3. Riscos associados à Transfusão

A transfusão de sangue pode promover a transmissão de doenças: anaplasmoses, micoplasmose, toxoplasmose, babesiose, tripanossomíase, theileríase, sarcocistose, além de viroses, tais como: hepatite infecciosa canina e leucemia felina (FELDMAN et al., 2000).

Para a realização de uma transfusão sanguínea em larga escala, é necessário, não só a disponibilidade dos componentes sanguíneos e sua utilização apropriada, mas também a qualidade dos componentes utilizados. Um programa de seleção apropriada dos doadores sanguíneos para doenças infecciosas deve ser realizado para minimizar os riscos de transmissão de doenças pelo uso da transfusão sanguínea (WARDROP et al., 2005).

2.3.1. Anaplasmoses

Uma das enfermidades que podem ser transmitidas pela transfusão sanguínea é a anaplasmoses, causada por uma Rickettsia, *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910), atualmente esse organismo intra-eritrocitário é classificado como pertencente ao grupo II das Ehrlichias com base na sequência de RNAr 16S (WALKER e DUMLER, 1996).

Várias espécies de carrapatos têm sido incriminadas a nível mundial, como vetores da anaplasmoses (KOCAN et al., 2004). O *Boophilus microplus* é

um ectoparasito hematófago originário da Ásia e atualmente é classificado como *Rhipicephalus microplus* (HORAK et al., 2002).

Em áreas tropicais e subtropicais em regiões do mundo, o principal vetor é o *Rhipicephalus microplus* (KOCAN et al., 2008). Este vetor é considerado um grande problema em áreas enzooticamente infestadas (RUYBAL et al., 2009), assim constituindo a quarta hemoparasitose mundial em importância econômica e tem impedido o desenvolvimento pecuário em diversas regiões (UILENBERG, 1995).

O *Anaplasma marginale* está amplamente distribuído nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo (PALMER, 1989). Está presente na América do Norte, América Central, América do Sul, Austrália e sudeste Africano (JAMES et al., 1985; DALGLIESH et al., 1990), sendo endêmica no México, América Central, região Caribeanas das Américas, Guianas, Venezuela e Colômbia (JAMES et al., 1985). A prevalência varia de 2,1 a 100% (PATARROYO et al., 1978; JONGEJAN et al., 1988; BAUMGARTNER et al., 1992; JORGENSEN et al., 1992). No Brasil, a prevalência da anaplasmoses também tem uma grande variação, com índices de 12,3 a 100% (RIBEIRO e REIS, 1981; OLIVEIRA et al., 1992; MADRUGA et al., 1994; ARTILES et al., 1995; VIDOTTO et al., 1998). A anaplasmoses é uma doença economicamente importante, por determinar perdas econômicas, devido à mortalidade, redução do peso e da produção de leite e aumento de custos com tratamentos (KOCAN et al., 2003; ALMEIDA et al., 2006).

O parasitismo intraeritrocitário dessa rickettsia é responsável pelo comprometimento da produção, por provocar anemia. A rickettsemia resultante pode comprometer de 10 a 90% dos eritrócitos circulantes, e há a probabilidade de ocorrer até 34% de mortalidade. Os bovinos que se recuperam da infecção tornam-se portadores crônicos, com baixos índices de parasitemia (KESSLER et al., 1998).

O ciclo do *Anaplasma marginale* no hospedeiro bovino é caracterizado pela adesão dos corpúsculos iniciais da rickettsia à superfície dos eritrócitos e sua penetração nessas células por meio de invaginação da membrana citoplasmática das mesmas, onde iniciam a formação de um vacúolo parasitóforo. A multiplicação de *Anaplasma marginale* no vacúolo parasitóforo se dá por divisão binária e as colônias resultantes (corpúsculos de inclusão)

possuem de oito a dez novos corpúsculos iniciais aptos a infectarem outros eritrócitos (PALMER et al., 1986). Esses corpúsculos intra-eritrocitários podem ser visualizados em microscopia óptica como pequenos pontos escuros, de localização periférica, variando entre 0,1µm a 0,8µm (FARIAS, 1995).

A anaplasmosose adquire maior importância em áreas geográficas onde o contato entre esse agente e os animais hospedeiros não é permanente, uma vez que não ocorre o estabelecimento de uma resposta imunológica protetora, favorecendo o aparecimento da infecção e as suas consequências (KESSLER et al., 1987). Nestas áreas torna-se evidente a necessidade de utilização de medidas preventivas.

Os métodos imunoproliféricos mais frequentemente utilizados no controle e prevenção da anaplasmosose bovina incluem a utilização de vacinas com parasitas vivos ou mortos, ou vacinas do tipo heterólogas com *Anaplasma centrale*, espécie não patogênica, mas que confere proteção cruzada (PATARROYO, 1992; VIDOTTO et al., 1995; VIDOTTO et al., 1998). Além da vacinação, a quimioprofilaxia com tetraciclina de longa duração (ROGERS e DUNSTER, 1984) e o controle estratégico de vetores ou a erradicação dos mesmos (OLIVEIRA, 1993) podem ser medidas úteis.

O *Anaplasma marginale* determina as formas clínicas aguda, superaguda ou crônica (RISTIC, 1981; MARTINS e CORRÊA, 1995), com um período pré-patente de 20 a 40 dias seguido por parasitemia. No pico da enfermidade, a queda do hematócrito é acentuada e mais de 75% dos eritrócitos podem estar infectados, com o quadro podendo persistir por uma a duas semanas (NASCIMENTO et al., 1981; KREIER et al., 1991). Os sinais observados consistem de apatia, esplenomegalia, dispnéia, taquicardia, febre, fadiga, lacrimejamento, sialorréia, diarreia, micção frequente, anorexia, perda de peso, aborto, às vezes agressividade, mucosas hipocoradas a ictéricas sugerindo anemia (RISTIC, 1981; ALDERINK e DIETRICH, 1983; BARBET, 1995; TAYLOR et al., 2009). Os sintomas estão associados à anemia resultante da remoção dos eritrócitos parasitados circulantes no baço e medula óssea pelo sistema fagocítico mononuclear. Nos casos mais graves, além da ictéria ocorre hipóxia que agrava o quadro clínico com o desenvolvimento de alterações do sistema nervoso central e abortos (BRINKMAN e KERSTING,

1990), ocasionalmente podendo levar o animal à morte em menos de 24 horas (FARIAS, 1995).

A anaplasmose pode acometer bovinos jovens e adultos, porém a severidade clínica da doença parece estar diretamente relacionada à idade (PARKER et al., 1985). Os casos fatais são mais frequentes em animais com idade superior a três anos (BRINKMAN e KERSTING, 1990). As infecções primárias em bovinos com idade abaixo de um ano têm menor probabilidade de apresentarem casos clínicos graves e estes animais ao se recuperarem da infecção desenvolvem uma imunidade duradoura (GUGLIELMONE, 1995).

A transferência de anticorpos maternos através da placenta não ocorre na espécie bovina, portanto os anticorpos colostrais são considerados importantes para a imunidade dos bezerros recém nascidos contra o *Anaplasma marginale* (RIBEIRO e REIS, 1981). No entanto, para outros autores, a presença de anticorpos colostrais anti-*Anaplasma* não provém proteção durável para bovinos lactantes. Esses autores acreditam que os anticorpos e outros fatores maternos ainda indefinidos, somente retardam as manifestações clínicas da infecção, conferindo apenas uma proteção parcial (ZAUGG e KUTTLER, 1984). Isso provavelmente está relacionado à persistência dos anticorpos colostrais, em torno de 12 a 40 dias, havendo após esse período uma população de bezerros susceptíveis à anaplasmose (MADRUGA et al., 1985).

Em área endêmica para *Anaplasma marginale*, os bezerros tendem a se infectarem nos primeiros meses de vida, sofrendo parasitemia moderada (RIBEIRO e REIS, 1981; HERRERO et al., 1998). A estação do ano influencia a ocorrência da infecção primária, uma vez que animais nascidos na estação seca apresentam maior risco de anaplasmose, quando expostos às elevadas taxas de transmissão durante a estação chuvosa subsequente. Isso porque grande número de bezerros já não possui a imunidade passiva conferida pelo colostro (HERRERO et al., 1998).

A literatura mostra uma grande variedade de testes laboratoriais que podem ser utilizados para a pesquisa direta do *Anaplasma marginale* e seus componentes, ou antígenos e anticorpos, que podem estar presentes nos humores de animais acometidos pela infecção. O diagnóstico laboratorial emprega métodos diretos e indiretos (Esfregaço Sanguíneo Corado por

Giemsa, testes de aglutinação e fixação do complemento até os mais sofisticados como: teste imunoenzimático (ELISA), Western blot e Reação em Cadeira de Polimerase), em que a escolha da prova está relacionada com a facilidade de execução e/ou dos reagentes, da infra-estrutura e capacidade técnica de cada laboratório (VIDOTTO e MARANA, 2001).

Na fase aguda da doença, quando a parasitemia é alta, o *Anaplasma* spp é facilmente detectado nos eritrócitos de bovinos, através do Esfregaço Sanguíneo Corado (ESC) pelo Método Panótico ou Giemsa (FAO, 1993; FARIAS, 1995). Entretanto, quando os animais se recuperam, tornando-se portadores, com baixa parasitemia, a visualização do parasita torna-se extremamente difícil e falha por esse método. Nesse sentido, técnicas como sondas de DNA, Reação em Cadeira de Polimerase (PCR) e outros métodos para detecção direta de antígenos, com boa sensibilidade e especificidade, têm sido pesquisadas e desenvolvidas para detecção do *Anaplasma* spp e/ou de seus componentes (FARIAS, 1995; BÖSE et al., 1995).

O diagnóstico indireto utilizado para pesquisa de anticorpos contra *Anaplasma marginale* é empregado em levantamentos epidemiológicos, possibilitando conhecer a porcentagem de animais portadores, o grau de proteção do rebanho, a faixa etária mais afetada. Os testes utilizados incluem a prova de aglutinação rápida, teste de aglutinação pelo látex, teste de hemaglutinação, prova de fixação de complemento (FC), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), teste imunoenzimático (ELISA) e Western Blot, os quais fornecem dados necessários para estabelecimento de programas de controle desta rickettsiose (KLAUS e JONES, 1968).

Novas metodologias de diagnóstico, com maior sensibilidade e especificidade, têm contribuído significativamente para a realização de estudos mais avançados sobre a epidemiologia da doença, permitindo a adoção de medidas profiláticas mais eficazes (VIDOTTO e MARANA, 2001). Diversas formas de controle têm sido empregadas como, medidas higiênico-sanitárias (fômites, controle de moscas e outros insetos), administração de medicamentos (oxitetraciclina ou clortetraciclina, controle de carrapatos, avaliação da resistência aos carrapaticidas), vacinas, e avaliação dos níveis de anticorpos, através de uma variedade de testes sorológicos capazes de avaliar o grau de imunidade dos rebanhos, estas medidas ainda levam em consideração os

custos e a zona de ocorrência desta rickettsiose (VIDOTTO e MARANA, 2001) a seleção adequada dos doadores de sangue e possíveis técnicas de inativação para *Anaplasma marginale*, já que a anaplasmosose é uma das enfermidades que pode ser transmitida através de transfusão sanguínea (REICHMANN e DEARO, 2001).

A importância dos carrapatos *Rhipicephalus microplus* na transmissão de *Anaplasma marginale* e consequentemente na pré-determinação da alta prevalência foi reavaliada por Gugliemone (1995) a partir da análise de dados epidemiológicos obtidos na América do Sul e Central. Em algumas regiões não foram encontradas associações entre as presenças de *Rhipicephalus microplus* e *Anaplasma marginale*, ou destes com a existência de alta prevalência.

A transmissão por tabanídeos foi demonstrada em quatro diferentes espécies (*Tabanus lineola*, *Tabanus fuscicostatus*, *Tabanus mularis* e *Tabanus pallidescens*) que foram capazes de transmitir *Anaplasma marginale* para bovinos (HAWKINS et al., 1982). Outra forma de transmissão de *Anaplasma marginale* é a iatrogênica, relacionada a equipamentos utilizados na vacinação, tatuagem e nas cirurgias (REEVES e SWIFT, 1977; BRINKMAN e KERSTING, 1990) que, no entanto, não parece ter importância epidemiológica, assim como a intra-uterina, embora verificada por diversos autores (NORTON et al., 1983; MADRUGA et al., 1984; ZAUGG, 1985; RIBEIRO et al., 1995).

2.4. Técnicas de Inativação

As mais promissoras abordagens na tentativa de inativação são métodos que têm como alvo o impedimento da replicação do patógeno no genoma. Dentre estas técnicas existe o tratamento com Riboflavina (vitamina B2) associada à radiação ultravioleta, Azul de metileno e Psoralen. Estudos *in vitro* foram realizados para garantir a segurança em termos de toxicidade para as células e/ou para os pacientes (SEGATCHIAN e DE SOUSA, 2006).

2.4.1. Inativação de plasma, plaquetas, sangue total e células vermelhas

A Riboflavina associada à radiação ultravioleta (UV), já tem sido utilizada como um agente de inativação de patógenos de plasma e plaquetas. Este

sistema de inativação a base de Riboflavina para patógenos de células vermelhas está em desenvolvimento (BRYANT e KLEIN, 2007).

A Riboflavina, vitamina B2, é uma estrutura planar tri-anelada, capaz de atravessar a membrana lipídica e fazer a intercalação e a oxidação do DNA e RNA na presença de radiação ultravioleta (UV), (KUMAR, 2004). A vitamina B2 é um componente elementar na dieta, apresentando uma baixa toxicidade, sendo esta uma grande vantagem da técnica em relação às demais, pois não se faz necessária a retirada de metabólitos antes de transfundir o sangue para o receptor (CORBIN, 2002; UNNA e GRESLIN, 1942 *apud* CALLAHAN, 2007; CARDO et al., 2007).

O uso da Riboflavina em combinação com a radiação UV tem uma efetividade na inativação de uma grande gama de patógenos tais como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) tanto intra quanto extracelular, vírus pseudorábico, vírus do Nilo ocidental, parvovírus, bactérias gram positivas (*Staphylococcus epidermitis*), bactérias gram negativas (*Escherichia coli*), e contra o protozoário *Leishmania*, sem comprometer os componentes sanguíneos através de subprodutos tóxicos ou que induzam efeitos colaterais adversos, preservando a atividade e a funcionalidade dos componentes do sangue (CORBIN, 2002; CARDO, 2007; PELLETIER, 2006 e RUANE, 2004 *apud* CALLAHAN, 2007).

O tratamento com Riboflavina associada à radiação UV foi efetivo contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae*. Porém, foi ineficiente contra *Candida albicans* e tem potencial para ser utilizado no tratamento de ceratites microbianas no futuro (MARTINS et al., 2008). Uma grande vantagem deste método é que este promove uma intensa redução dos níveis virais e bactérias presentes no sangue a ser transfundido (SOLHEIM e SEGATCHIAN, 2006).

Segundo Cardo et al. (2007), o tratamento através da associação da Riboflavina com a radiação ultravioleta utilizando o aparelho Mirasol PRT foi eficaz na inativação de *Trypanosoma cruzi* contido em bolsas para transfusão contendo plasma e plaquetas.

Corbin (2002) sugere que ela poderia agir como um fotossensibilizador útil para a inativação de agentes patogênicos encontrados em produtos de sangue.

O tratamento de bolsas de sangue para transfusão através da técnica com Riboflavina associada à radiação UV tem se mostrado muito eficaz, mas esta técnica ainda se apresenta com desenvolvimento em curso. O conhecimento do perfil toxicológico, da Riboflavina e de seus derivados, seu uso extenso em nossa dieta assim como o uso de um fotossintetizador eficaz na inativação de patógenos torna essa molécula um candidato promissor para ser utilizado no sangue (GOODRICH, 2000).

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi dividido em duas etapas experimentais:

Na primeira etapa foram observadas as alterações do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, de 1 a 4°C por 21 dias.

Na segunda etapa inicialmente foram separadas duas alíquotas de sangue parasitado com *Anaplasma marginale*, a primeira alíquota não foi submetida a nenhum tipo de tratamento, e na segunda alíquota foi realizado o tratamento pela ação da Riboflavina associada à radiação ultravioleta, posteriormente estes sangues foram inoculados em bezerros esplenectomizados e não esplenectomizados.

3.1. Local da pesquisa

O experimento foi realizado no Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte (EMBRAPA), Campo Grande - MS.

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório Clínico Veterinário “Profa. Dra. Aguemi Kohayagawa” e de Enfermidades Parasitárias “Profa. Dr. Mauro Rodrigues de Oliveira” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, “Julio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu - SP, e no Laboratório Clínico Veterinário, Pet Lab, Campo Grande - MS.

3.2. Animais utilizados

A EMBRAPA Gado de Corte disponibilizou 122 bovinos mestiços Nelore/Caracu e destes pela Reação em Cadeia Polimerase (PCR) foram selecionados 17 animais negativos para *Anaplasma marginale*. Foram utilizados bezerros com idades entre oito a 12 meses, de ambos os sexos, com peso médio de 200 kg.

Durante a adaptação, um animal foi excluído devido a um problema de hiperplasia interdigital e outro animal foi excluído por fratura de membro. As cirurgias de esplenectomia foram realizadas após o período de adaptação em dez animais, porém cinco animais morreram no pós-operatório.

Dois bezerros foram utilizados na primeira etapa. Sendo um bezerro clinicamente saudável e um bezerro conhecidamente parasitado, o qual foi inoculado por via subcutânea, com uma cepa de *Anaplasma marginale* de alta patogenicidade, contendo $3,2 \times 10^7$ eritrócitos infectados (Origem Pernambuco – Zona da Mata), fornecida pela EMBRAPA, Campo Grande, MS.

Na segunda etapa foram utilizados oito bezerros, dois esplenectomizados que receberam sangue parasitado sem tratamento por Riboflavina associada à radiação ultravioleta, três animais hígidos e três animais esplenectomizados, que receberam sangue tratado com Riboflavina associada à radiação UV.



FIGURA 1. Animais mestiços Nelore/Caracu durante manejo para seleção dos grupos experimentais

3.3. Manejo dos animais

Os animais foram cedidos pela EMBRAPA, já vermifugados, com ivermectina e vacinados (Brucelose, Leptospirose, Rinotraqueíte Infecciosa

Bovina e Diarréia Viral Bovina) de acordo com o calendário da unidade de pesquisa EMBRAPA Gado de Corte. O controle de ectoparasitas era realizado a cada 21 dias, com banho carrapaticida com solução de Amitraz a 12,5 g, diluído na proporção de uma parte de Amitraz em 500 partes de água.

Os animais foram mantidos em uma área de isolamento, onde recebiam uma vez ao dia ração produzida na EMBRAPA Gado de Corte, volumoso duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

3.4. Esplenectomia

Foram feitas as cirurgias de esplenectomia total. As esplenectomias foram realizadas segundo Vidotto e Marana (2001), tornando os bezerros mais susceptíveis à infecção por *Anaplasma marginale*.

Os animais foram submetidos a um jejum alimentar de 24 horas e hídrico por 12 horas, antes do procedimento cirúrgico. No pré-operatório foi realizada a tricotomia e desinfecção do flanco esquerdo. Como pré-anestésico foi utilizado Cloridrato de Xilazina na concentração de 0,25 mg/kg associado a Cloridrato de Cetamina na dose de 5 mg/kg, por via intramuscular. O bloqueio anestésico local foi feito com lidocaína na técnica de “L invertido”.

A incisão na pele teve amplitude de aproximadamente 20 centímetros, no sentido póstero-inferior a partir da borda caudal da 13ª costela. A tela subcutânea também foi incisada, os músculos oblíquo interno e externo do abdômem foram afastados e a fáscia transversa e o peritônio seccionados. Aberta a cavidade peritoneal, foi realizada a dilaceração dos ligamentos frenicoesplênicos e renoesplênicos. A partir do hilo do baço foi feita uma ligadura, com fio catgut n°3, tomando os vãos e nervos esplênicos. Foi colocada uma pinça próxima ao baço e feita a secção entre esta e a ligadura, e o baço foi exteriorizado. Removido o baço foi realizada a sutura em massa, com fio catgut n°3, pontos em “x”, dos músculos abdominais, fáscia transversa e peritônio. A sutura da pele foi feita com pontos de fio de nylon (SILVA et al., 1998).

3.5. Pós-operatório

Os curativos foram realizados pela limpeza da ferida com solução fisiológica a 0,9% associada à tintura de iodo e, posteriormente era feita a pomada cicatrizante, por um período médio de 15 dias. Também foi realizada antibioticoterapia com Enrofloxina na dose de 5 mg/kg, uma vez ao dia, por sete dias, pela via intramuscular e Flunixin meglumine na dose de 1,1 mg/kg, uma vez ao dia, por três dias.

Os pontos da pele foram retirados aproximadamente 15 dias após o procedimento cirúrgico, dependendo da cicatrização de cada animal.

Apesar dos cuidados e tratamentos realizados, cinco bezerros morreram no pós-operatório.

3.6. Colheita das amostras

As amostras foram colhidas através de punção da veia jugular externa com os animais em estação, contidos adequadamente. O local para a colheita foi preparado com tricotomia e antissepsia. Foram colhidas oito bolsas de sangue plásticas com conservante do tipo Citrato Fosfato Dextrose Adenina-1 (CDPA-1) e mantidos refrigerados a uma temperatura de 1 a 4° C durante 21 dias. Durante a colheita o sangue foi movimentado constantemente de modo que o mesmo fosse apropriadamente homogeneizado. Para facilitar a colheita, a bolsa plástica foi posicionada em um nível mais baixo de modo que a força da gravidade ajudasse no processo.

3.7. Etapas e grupos experimentais

O experimento foi dividido em duas etapas experimentais.

3.7.1. Primeira etapa experimental

O grupo I foi composto por oito bolsas plásticas contendo sangue de bovino clinicamente saudável. O grupo II foi formado por oito bolsas plásticas contendo sangue proveniente de bezerro parasitado com *Anaplasma*

marginale, 17 dias após a inoculação. Em ambos os grupos foram colhidas amostras sanguíneas das bolsas conservadas em geladeira, a cada três dias durante o período de 21 dias de armazenamento. Foram realizados os seguintes exames laboratoriais: Contagem Total de Hemácias (He), Concentração de Hemoglobina (Hb), Concentração do Volume Globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Contagem Total de Leucócitos (Leucócitos), Determinação de Proteína Plasmática Total (PPT), Concentração de Fibrinogênio Plasmático e Concentração sérica de Sódio (Na⁺), Potássio (K⁺) e Lactato.

TABELA 1. Valores de referência de bovinos normais para Hemograma segundo o Laboratório Clínico Veterinário “Profa. Dra. Agumi Kohayagawa”.

	He (x10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	VG (%)	VCM (fL)	Leucócitos (x10 ³ /μL)	PPT (g/dL)	Fibrinogênio (%)
Bovino	5,0 a 10,0	8 a 15	24 a 46	40 a 60	4,0 a 12,0	7 a 8,5	300 a 700

TABELA 2. Valores de referência de bovinos normais para Bioquímica segundo o Laboratório Clínico Veterinário “Profa. Dra. Agumi Kohayagawa”.

	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)	Lactato (mg/dL)
Bovino	132 a 152	3,9 a 5,8	5 a 20

3.7.2. Segunda etapa experimental

Após 21 dias de conservação do sangue parasitado em bolsas plásticas para transfusão, foram realizadas avaliações da presença do parasita, utilizando como métodos para diagnóstico: Esfregaço Sanguíneo Corado (ESC), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR). Depois este sangue parasitado foi submetido ao tratamento por Riboflavina associada à radiação ultravioleta. Após o tratamento, o sangue foi novamente submetido à avaliação pelos métodos: Esfregaço Sanguíneo Corado, RIFI e qPCR. O sangue parasitado tratado e não tratado foi inoculado em bezerros que foram divididos em três grupos. Grupo III: formado por dois animais esplenectomizados que receberam sangue

parasitado sem tratamento por Riboflavina associada à radiação ultravioleta. Grupo IV: formado por três animais hígidos, que receberam sangue de bovino parasitado tratado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta. Grupo V: formado por três animais esplenectomizados, que receberam o sangue parasitado tratado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta.

Os animais foram avaliados diariamente por meio de Esfregaço Sanguíneo Corado, Concentração do Volume Globular, avaliação da coloração das mucosas e temperatura corporal.

No momento zero, antes da inoculação e aos sete, 14 e 21 dias após inoculação foram feitas colheitas de amostras sanguíneas de todos os animais para diagnóstico da hemoparasitose por meio do ESC e qPCR. A avaliação pela RIFI foi realizada nos momentos sete, 14 e 21 dias pós-inoculação.



FIGURA 2. Tratamento do sangue parasitado com *Anaplasma marginale* na tentativa de inativação com Riboflavina associada à radiação ultravioleta.

3.7.3. Redução de patógenos através de tratamento com Riboflavina associada à radiação ultravioleta

A técnica utilizada neste experimento seguiu modelo semelhante ao preconizado por Bryant e Klein (2007) e Cardo (2007). O sangue estocado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 foi adicionado a 500 μM de Riboflavina diluída em solução fisiológica de modo a atingir a concentração final de 50 μM .

Durante a irradiação no aparelho Estação de trabalho para PCR, DNA Workstation (Loccus Biotecnologia®), foram utilizados frascos de poliestireno para armazenar os 50 mL de sangue associado à solução de Riboflavina. A irradiação foi de 6.24 J/mL, com comprimento de onda de 254 nm. O tratamento foi feito em 30 ciclos onde a cada 90 segundos as amostras eram homogenizadas por 60 segundos de modo que a radiação fosse uniforme. Ao final dos 21 dias de estocagem e imediatamente após o tratamento com Riboflavina associada à radiação ultravioleta, o sangue foi transfundido em bezerros clinicamente saudáveis para posterior avaliação conforme descrito na segunda etapa experimental.

3.8. Momentos das avaliações laboratoriais

Na primeira etapa foram feitas retiradas de amostras sanguíneas das bolsas dos grupos 1 e 2, conservadas em geladeira em temperatura variando de 1 a 4° C, durante o período de 21 dias de armazenamento, e a cada três dias foram realizadas análises laboratoriais, totalizando oito momentos diferentes de análise. Os momentos de análise laboratorial podem ser conferidos no quadro a seguir (Quadro 1).

Na segunda etapa as análises laboratoriais foram realizadas em três momentos, o primeiro após sete dias da inoculação de sangue, e nos dias 14 e 21 pós-inoculação. Os momentos de análise laboratorial podem ser conferidos no quadro a seguir (Quadro 2).

QUADRO 1. Momentos de análise laboratorial da primeira etapa experimental em bolsa plástica.

Momento 0	M0	Logo após a colheita
Momento 1	M1	3 dias após a colheita
Momento 2	M2	6 dias após a colheita
Momento 3	M3	9 dias após a colheita
Momento 4	M4	12 dias após a colheita
Momento 5	M5	15 dias após a colheita
Momento 6	M6	18 dias após a colheita
Momento 7	M7	21 dias após a colheita

QUADRO 2. Momentos de análise laboratorial da segunda etapa experimental nos bezerros a serem testados.

Momento 8	M8	Tratamento do sangue parasitado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta
Momento 9	M9	7 dias após a inoculação do sangue tratado
Momento 10	M10	14 dias após a inoculação do sangue tratado
Momento 11	M11	21 dias após a inoculação do sangue tratado

3.9. Avaliação laboratorial

3.9.1. Primeira etapa experimental

As amostras sanguíneas da primeira etapa experimental foram analisadas em oito momentos, a cada três dias, onde foram realizadas as seguintes análises:

3.9.1.1. Hemograma

A Contagem Total de Hemácias (He), Concentração de Hemoglobina (Hb) e Contagem Total de Leucócitos, foi realizada a pelo contador automático de células sanguíneas CELM®, CC-500.

A determinação da Concentração do Volume Globular (VG) foi feita seguindo o método de microhematócrito, conforme descrito por Weiss e Wardrop (2010).

O Volume Corpuscular Médio (VCM) foi obtido por um cálculo aritmético a partir do Volume Globular e da contagem de Hemácias da amostra, como descrito por Kerr (2003).

A determinação de Proteína Plasmática Total (PPT) foi realizada por refratometria segundo Feldman (2000).

Para determinação do Teor de Fibrinogênio Plasmático, foi utilizado o método da precipitação pelo calor, descrito por Thrall (2007).

3.9.1.2. Bioquímica

As amostras foram centrifugadas imediatamente após a colheita e em seguida o plasma foi congelado para posterior análise.

A determinação da concentração de Sódio (Na^+) e Potássio (K^+) plasmáticos foi realizada pelo método de fotometria de chama utilizando o kit da CELM®, no fotômetro FC-280.

A concentração de Lactato plasmático foi obtida pela dosagem no analisador bioquímico com kit da KATAL®, no aparelho Cobas Mira Plus da Roche®.

3.9.2. Segunda etapa experimental

As amostras sanguíneas obtidas *in vivo* da segunda etapa experimental foram analisadas em três momentos, a cada sete dias, para teste diagnósticos (exame parasitológico, RIFI e qPCR) e inoculação em bezerros esplenectomizados e não esplenectomizados, onde foram realizadas as seguintes análises:

3.9.2.1. Inoculação em bezerros esplenectomizados

A inoculação em bezerros susceptíveis foi realizada com objetivo de verificar se o parasita manteve sua capacidade de se alojar e multiplicar ou se

desenvolver no hospedeiro, após tratamento com Riboflavina associada à radiação ultravioleta.

Esses animais foram avaliados diariamente por meio de Esfregaço Sanguíneo Corado (ESC), VG, avaliação de mucosas e temperatura corporal, por um período de 21 dias.

3.9.2.2. Pesquisa de hematozoários

É a principal ferramenta para o diagnóstico laboratorial específico de casos clínicos. O sangue foi colhido de capilares sanguíneos da margem da orelha e o esfregaço sanguíneo foi realizado conforme descrito por Thrall (2007). No laboratório foi realizada a coloração de Diff-Quick, seguindo técnica descrita por Thrall (2007) respectivamente. As lâminas foram lavadas e secadas imediatamente. A observação foi feita no microscópio com objetiva de imersão (1.000 x).

O *Anaplasma marginale*, como as demais rickettsias, apresentou-se como uma pequena esfera de cor violeta escura, localizada na margem interna dos eritrócitos.

A verificação da parasitemia (estimada pela porcentagem de eritrócitos parasitados) foi feita pela contagem de, pelo menos, 1000 eritrócitos, contando-se, separadamente, parasitados e não parasitados. Através da regra de três, calculou-se a porcentagem de parasitemia. Em casos clínicos por *Anaplasma marginale*, a parasitemia está a cima de 1,0% (KESSLER e SCHENK, 1998).

3.9.2.3. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), seguiu o modelo descrito por Madruga et al. (2000), onde foram distribuídos 10 microlitros do soro teste para *Anaplasma marginale*, diluídos a 1:320 e a 1:640 em PBS pH 7,2 e, 10 microlitros do soro controle positivo forte e fraco e em controle negativo para *Anaplasma marginale*, diluídos a 1:320 em PBS pH 7,2. As lâminas foram incubadas por trinta minutos a 37°C em câmara úmida e depois lavadas sob fraca agitação, três vezes em PBS pH 7,2 por dez minutos e secas por cerca de dez minutos em temperatura ambiente.

Posteriormente foram adicionados 10 microlitros da anti-IgG bovina conjugada com FITC (Sigma Chemical®) para *Anaplasma marginale*, diluída a 1:640 em PBS pH 7,2. As lâminas foram novamente incubadas por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida, lavadas sob fraca agitação, duas vezes em PBS pH 7,2 dez minutos e uma vez em tampão fosfato, por cinco minutos, secas em ambiente escuro, e observadas em microscópio de imunofluorescência. As amostras consideradas positivas tiveram título de $\geq 1:320$ para *Anaplasma marginale*.

3.9.2.4. Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa (qPCR)

A detecção e quantificação de DNA de *Anaplasma marginale*, seguiu modelo semelhante ao descrito por Carelli et al. (2007).

Para o diagnóstico de *A. marginale*, uma região de aproximadamente 95 pares de base do gene *msp1b* foi amplificada por meio de um protocolo baseado numa reação de PCR em tempo real utilizando o sistema SYBR. Uma reação de PCR em tempo real para a detecção e quantificação simultânea do DNA de *A. marginale* foi realizada no termociclador 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Cada reação de PCR consistiu de: 12.5 µL de Maxima™ SYBR Green/Rox qPCR master mix; 0.8 µL do primer forward and primer reverse [400 nmol l⁻¹]; 2 µL do DNA da amostra e água *nuclease free* para o total de 25 µL.

As condições de amplificação da reação seguiram o seguinte protocolo: 1 ciclo de incubação inicial a 95°C por 10 minutos para desnaturação das fitas de DNA, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 45 segundos e 60°C por 60 segundos (anelamento-extensão) e adicionado um estágio de dissociação para a reação. O ensaio foi realizado em duplicata para cada amostra desconhecida e um controle positivo (Cepa de DNA disponibilizada pela EMBRAPA Gado de Corte, com $3,2 \times 10^7$ eritrócitos infectados com *A. marginale*. Origem: Pernambuco - Zona da Mata) e um negativo foi acrescentado em cada bateria de análise.

Amostras de resultados com concentração relativa $<0,1$ foram consideradas como reagentes positivas. As amostras com valores menores

que o limiar de quantificação do teste de qPCR, foram consideradas como não reagentes.

3.10. Recuperação terapêutica dos animais infectados

Após o termino do experimento todos os animais que apresentaram presença de *Anaplasma marginale* em um dos testes de ESC, RIFI e/ou qPCR, foram tratados a base de Oxitetraciclina (dihidratada) na dose de 1 mL para cada 10 kg de peso. A administração do fármaco foi feita por via intramuscular, usando-se agulhas de calibre e comprimento apropriados. Não foi injetado mais de 10 mL em um mesmo local.

3.11. Análise Estatística

Para primeira etapa do experimento foi realizada análise de medidas repetidas (Two Way Repeated measures ANOVA) comparando os dois grupos no decorrer dos oito momentos considerando 5% de nível de significância. Também foi realizado para comparar as médias o Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Na segunda etapa foi realizada análise descritiva individual de cada bezerro, nos três grupos experimentais.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Primeira etapa experimental

4.1.1. Contagem Total de Hemácias

Os valores médios e desvio padrão obtidos na Contagem Total de Hemácias (He), ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) estão descritos na tabela 3.

Observou-se uma redução ($P>0.05$) dos valores médios das hemácias durante o período de armazenamento por 21 dias, para ambos os grupos. O grupo I iniciou com o valor médio de $6,55 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($\pm 1,03$), reduzindo após os 21 dias para $4,60 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($\pm 1,01$).

TABELA 3. Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores da Contagem Total de Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu -SP, 2011.

Momento	Grupo I	Grupo II
0	$6,55 \pm 1,03$ aA	$5,49 \pm 0,62$ aA
1	$6,32 \pm 1,12$ aA	$5,38 \pm 0,66$ bA
2	$5,92 \pm 0,83$ aA	$4,42 \pm 0,69$ bA
3	$5,90 \pm 1,11$ aA	$4,24 \pm 0,64$ bB
4	$4,74 \pm 1,36$ aA	$3,82 \pm 0,50$ bA
5	$4,88 \pm 0,54$ aA	$3,44 \pm 0,62$ cA
6	$4,96 \pm 0,44$ aA	$3,94 \pm 0,82$ bA
7	$4,60 \pm 1,01$ aA	$3,61 \pm 0,63$ bA

*Médias não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P>0,05$).

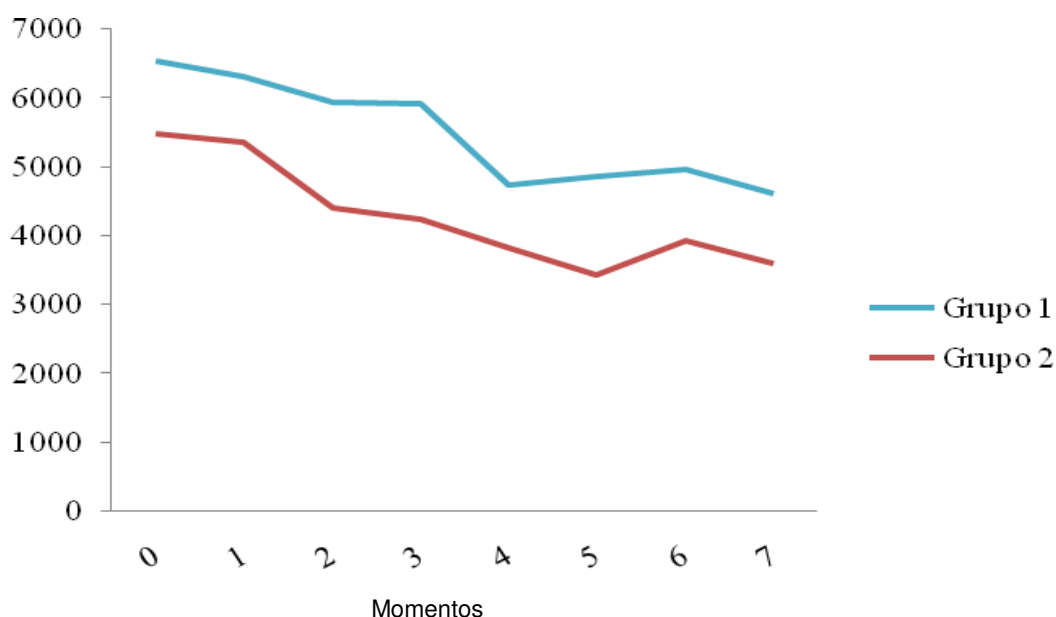


FIGURA 3. Valores médios da Contagem Total de Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu -SP, 2011.

O grupo II, no momento zero apresentou o valor médio de $5,49 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($\pm 0,62$), reduzindo para $3,61 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($\pm 0,63$) no momento sete. Ambos os grupos após o período de 21 dias, apresentaram valores médio abaixo dos valores de referência. Na análise de variância houve efeito significativo para grupo e para momento ($P < 0,05$), porém não houve efeito da interação ($P > 0,05$) (Figura 3).

A diminuição de hemácias ocorreu devido a hemólise, que pôde ser observada no plasma das bolsas durante o período de armazenamento, este achado também foi demonstrado por Ribeiro Filho et al. (1992), Almosny et al. (2000), Fisher et al. (2004), Bazan (2008) e Souza et al. (2009).

4.1.2. Concentração de Hemoglobina

As médias e desvio padrão dos valores da Concentração de Hemoglobina (Hb), (g/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, proveniente de Campo Grande, MS, nos oito momentos de

análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) podem ser visualizados na tabela 4.

Neste estudo ocorreu uma redução dos valores médios de hemoglobina para ambos os grupos. O grupo I apresentou uma concentração de hemoglobina de 9,95 g/dL ($\pm 0,56$) no primeiro momento, reduzindo sem diferença significativa para 8,61 g/dL ($\pm 0,41$) aos 21 dias. O grupo II, iniciou com o valor médio já abaixo do valor de referência, no primeiro momento foi de 7,76 g/dL ($\pm 2,36$) e apresentou uma significativa redução onde, ao final do período de armazenamento, chegou a atingir 3,24 g/dL ($\pm 2,58$). Houve diferença estatística entre os grupos em todos os momentos de análise ($P>0,05$), (Figura 4).

TABELA 4. Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores da Concentração de Hemoglobina (g/dL) de bezerras mestiças Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

Momento	Grupo I	Grupo II
0	9,95 $\pm$ 0,56 aA	7,76 $\pm$ 2,36 bA
1	10,1 $\pm$ 0,98 Aa	7,60 $\pm$ 1,39 bA
2	9,70 $\pm$ 1,15 aA	5,49 $\pm$ 2,16 bB
3	9,96 $\pm$ 0,93 aA	4,12 $\pm$ 2,12 bBC
4	9,68 $\pm$ 0,83 aA	4,56 $\pm$ 2,03 bBC
5	8,69 $\pm$ 1,41 aA	3,62 $\pm$ 1,51 bC
6	8,60 $\pm$ 1,21 aA	3,70 $\pm$ 1,90 bC
7	8,61 $\pm$ 0,41 aA	3,24 $\pm$ 2,58 bC

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P>0,05$).

Esta redução no valor médio da Hb pode ser justificada pela hemólise observada durante o período de armazenamento em bolsas de transfusão por 21 dias, pois a conservação influencia a fragilidade osmótica das hemácias, favorecendo a lise e desnaturação de hemoglobina plasmática. Estes

resultados corroboram com o encontrado por Ribeiro Filho et al. (1992), Almosny et al. (2000), Fisher et al. (2004) e Souza et al. (2009).

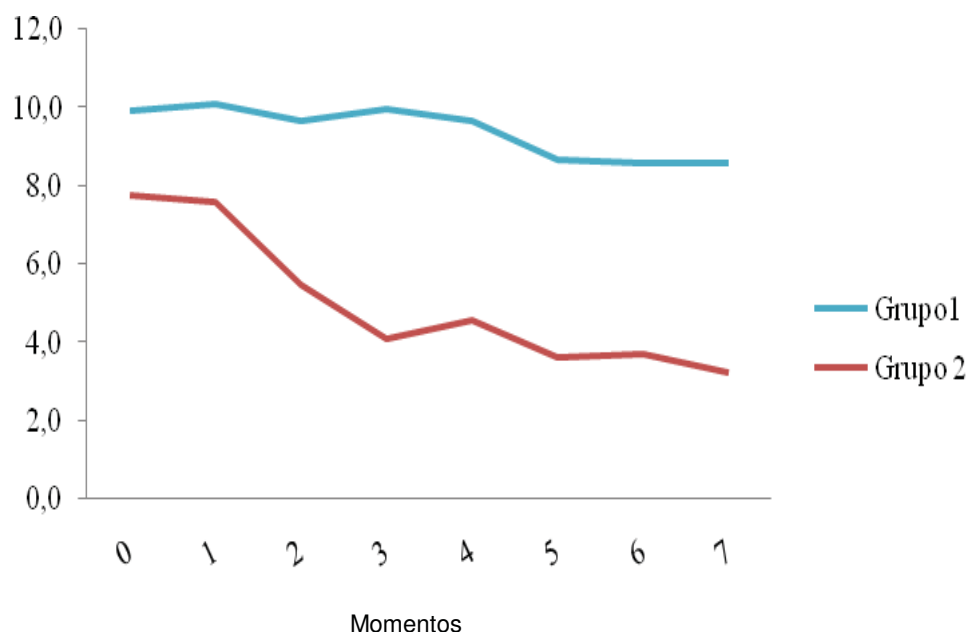


FIGURA 4. Valores médios da Concentração de Hemoglobina (g/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

4.1.3. Concentração do Volume Globular

Os valores médios e desvio padrão do Volume Globular (VG), (%) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) esta apresentada na tabela 5.

Ambos os grupos apresentaram uma redução entre o primeiro e o último momento do experimento. O grupo I apresentou média de variação no primeiro momento de 29,62% ($\pm 1,36$), reduzindo para 23,62% ($\pm 2,13$). No grupo II, o VG já apresentava-se diminuído desde o primeiro momento, com 19,25% ($\pm 1,25$) reduzindo para 10,38% ($\pm 6,69$). Houve diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$), (Figura 5).

TABELA 5. Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores do Volume Globular (%) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

Momento	Grupo I	Grupo II
0	29,62 $\pm$ 1,36 aA	19,25 $\pm$ 1,25 bA
1	30,12 $\pm$ 3,59 aA	18,38 $\pm$ 2,39 bAB
2	28,12 $\pm$ 2,83 aAB	15,50 $\pm$ 5,75 bB
3	24,62 $\pm$ 2,56 aBC	11,25 $\pm$ 5,01 bC
4	24,62 $\pm$ 3,02 aBC	9,50 $\pm$ 3,56 bC
5	24,88 $\pm$ 5,14 aBC	11,38 $\pm$ 3,62 bC
6	24,00 $\pm$ 3,16 aC	10,75 $\pm$ 4,99 bC
7	23,62 $\pm$ 2,13 aC	10,38 $\pm$ 6,69 bC

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

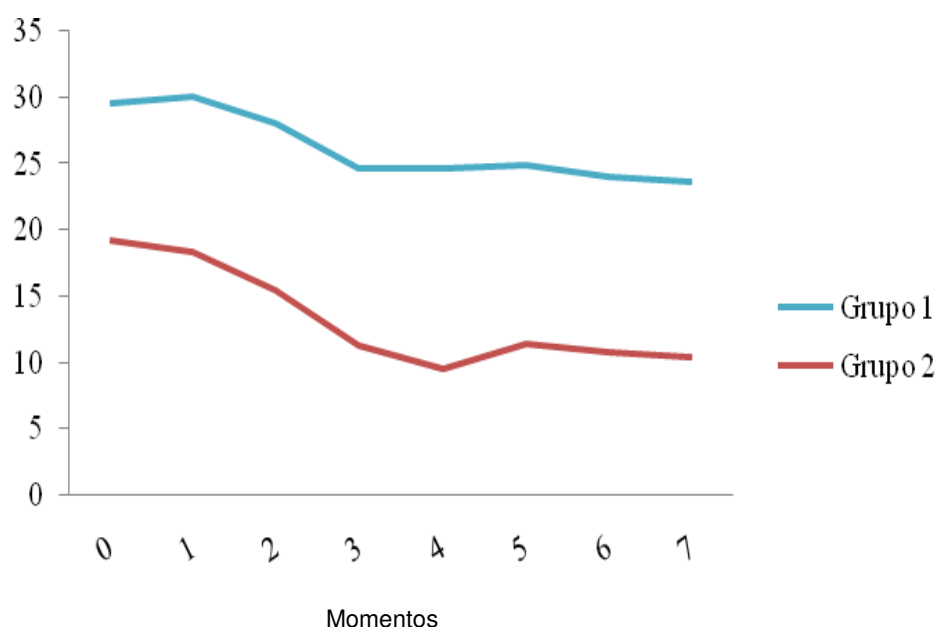


FIGURA 5. Valores médios do Volume Globular (%) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

De acordo com Kessler et al. (1998), nos casos de anaplasmoses, o Volume Globular pode decrescer em mais de 50% em relação ao valor normal para bovinos, podendo atingir valores menores que 10%. O número de células eliminadas não é proporcional ao número de células parasitadas, devido à destruição imunomediada de eritrócitos não parasitados pelas células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) e por imunoglobulinas (LOSOS, 1986; RICHEV, 1993 e FELDMAN et al., 2000).

Provavelmente a redução ocorreu devido as lesões de estoque das hemácias conservadas em bolsas para transfusão contendo CPDA-1, devido a hemólise, como relatam Ribeiro Filho et al. (1992), Almosny et al. (2000), Fisher et al. (2004) e Souza et al. (2009).

4.1.4. Volume Corpuscular Médio (VCM)

Os valores médios e desvio padrão do Volume Corpuscular Médio (VCM), (fL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, proveniente de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) estão descritos na tabela 6.

Os resultados obtidos no grupo I, foram de 45,5 fL ($\pm 5,9$) no momento 0 sofrendo um discreto aumento até 54,0 fL ($\pm 2,7$) no momento 7. O grupo II, iniciou com o valor médio abaixo do parâmetro de referência, com 34,7 fL ($\pm 4,8$) no momento 0, reduzindo para 29,8 fL ($\pm 7,0$) no momento 7. Os resultados mostraram que houve diferença estatística significativa entre os grupos I e II para VCM em todos os momentos (de 0 a 7) avaliados. Dentro no grupo I só houve diferença estatística entre os momentos 3 e 4 e ambos não diferiram dos demais. Dentro do grupo II não houve diferença entre os momentos (Figura 6).

Os resultados obtidos no grupo I se assemelham ao encontrados por Valeri et al. (1982) e Souza et al. (2009), justificando que o aumento do VCM no 21º dia e 35º dia, pode ser explicado pelas variações no volume de hemácias durante a conservação. Esta alteração deve-se a falência da bomba de Na^+/K^+ , acúmulo de substâncias osmóticas e a perda progressiva da área de superfície da hemácia.

TABELA 6. Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores do Volume Corpuscular Médio (fL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

Momento	Grupo I	Grupo II
0	45,68 $\pm$ 2,57 aAB	34,75 $\pm$ 4,92 bA
1	48,98 $\pm$ 8,13 aAB	34,06 $\pm$ 4,86 bA
2	48,56 $\pm$ 7,96 aAB	35,28 $\pm$ 1,08 bA
3	43,06 $\pm$ 8,60 aA	27,16 $\pm$ 4,85 bA
4	56,65 $\pm$ 18,36 aB	25,58 $\pm$ 4,94 bA
5	51,99 $\pm$ 5,26 aAB	34,25 $\pm$ 6,21 bA
6	49,02 $\pm$ 3,55 aAB	28,50 $\pm$ 6,02 bA
7	54,08 $\pm$ 13,17 aAB	29,84 $\pm$ 6,82 bA

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

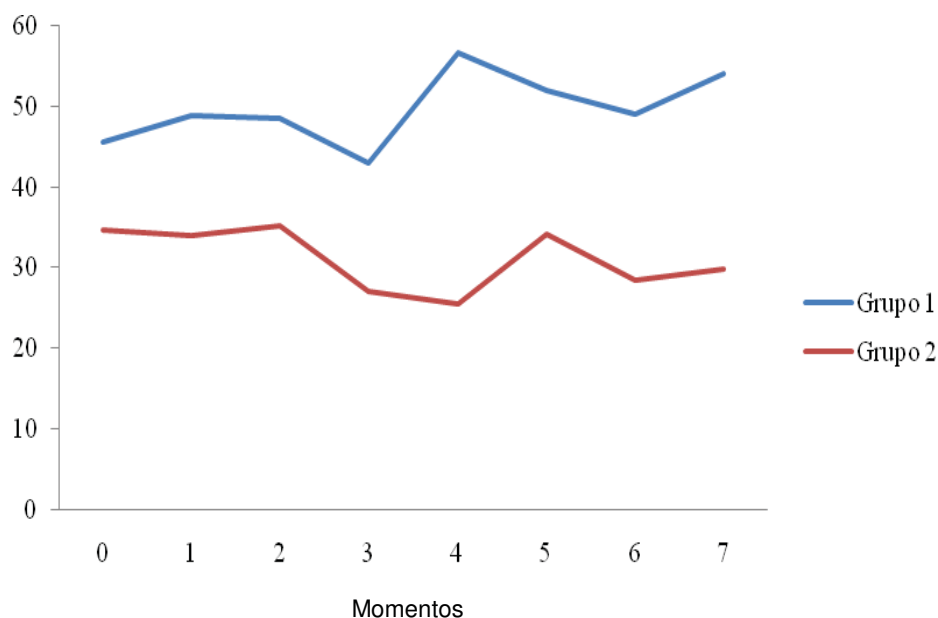


FIGURA 6. Valores médios do Volume Corpuscular Médio (fL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

Segundo Ribeiro Filho et al. (1992), o plasma torna-se hipertônico pelo desequilíbrio osmótico intra-eritrocitário, hemólise, aumento da acidez, falha na bomba Na^+/K^+ e diminuição do colesterol na membrana eritrocitária. Consequentemente, há uma diminuição gradual do VCM, pois as hemácias desidratam e tornam-se menores, o que possivelmente pode ter ocorrido com o grupo II.

4.1.5. Proteína Plasmática Total

As médias e desvio padrão da Proteína Plasmática Total (PPT), (g/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, proveniente de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) podem ser observadas na tabela 7.

Os níveis plasmáticos médios de PPT reduziram nos grupos I e II. No grupo I, foi de 6,61 g/dL ($\pm 0,67$) no primeiro dia do armazenamento, para 5,32 g/dL ($\pm 0,58$) no último dia de armazenamento. No momento 0 o valor médio encontrado no grupo II, foi de 8,7 ($\pm 1,67$) e no momento 7 reduziu para 5,82 ($\pm 1,62$). Os grupos I e II sofreram uma diminuição dos valores e no momento 3 até o momento 6 permaneceram com médias estatisticamente muito semelhantes (Figura 7).

Em ambos os grupos observou-se que ocorreu uma diminuição na concentração de proteínas plasmáticas, que manteve-se estável a partir do momento três.

Ribeiro Filho et al. (1992), Costa Júnior (2006) e Souza et al. (2009) também observaram uma diminuição na concentração de proteínas plasmáticas durante o período de armazenamento.

Para Cairutas (1985) esta diminuição pode ocorrer por uma desnaturação protéica durante o período de estocagem, provavelmente ocasionado pela diminuição do pH sanguíneo.

TABELA 7. Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores de Proteína Plasmática Total (g/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

Momento	Grupo I	Grupo II
0	6,61 $\pm$ 0,67 bA	8,70 $\pm$ 1,67 aA
1	6,48 $\pm$ 0,67 bA	8,62 $\pm$ 1,58 aA
2	6,58 $\pm$ 0,51 bA	8,58 $\pm$ 1,61 aA
3	5,32 $\pm$ 0,67 aC	5,30 $\pm$ 1,57 aD
4	5,70 $\pm$ 0,67 aB	5,65 $\pm$ 1,62 aBC
5	5,30 $\pm$ 0,43 aC	5,45 $\pm$ 1,57 aCD
6	5,65 $\pm$ 0,72 aB	5,58 $\pm$ 1,59 aBCD
7	5,32 $\pm$ 0,58 bC	5,82 $\pm$ 1,62 aB

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

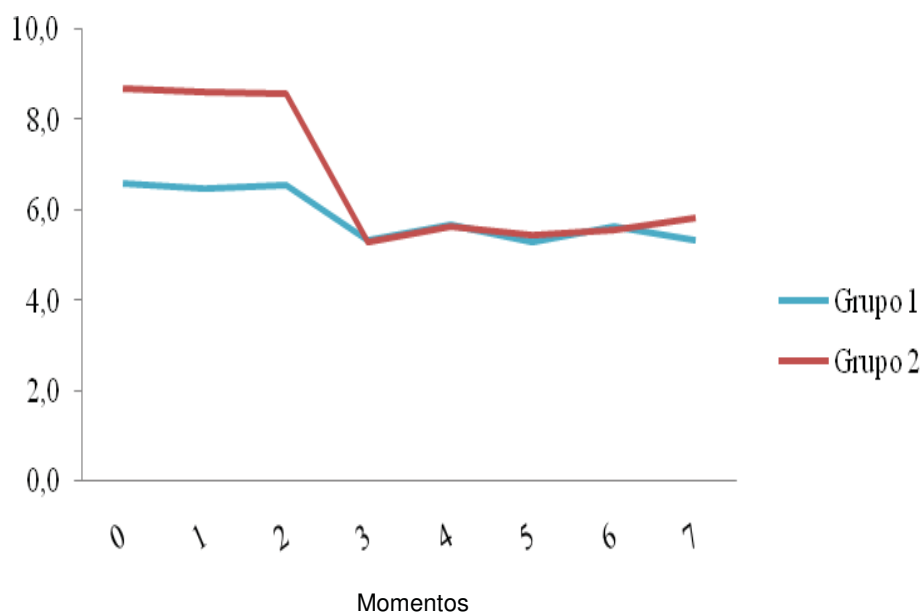


FIGURA 7. Valores médios de Proteína Plasmática Total (g/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

4.1.6. Fibrinogênio

As análises de variação da concentração média do Fibrinogênio plasmático (g/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, proveniente de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) estão descritas na tabela 8.

TABELA 8. Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores de Fibrinogênio plasmático (mg/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

Momento	Grupo I	Grupo II
0	280 $\pm$ 128,2 aA	300 $\pm$ 166,9 aC
1	450 $\pm$ 0,00 aA	300 $\pm$ 239,0 bC
2	380 $\pm$ 70,2 aA	380 $\pm$ 225,2 aBC
3	380 $\pm$ 0,00 bA	530 $\pm$ 128,2 aAB
4	350 $\pm$ 103,5 bA	630 $\pm$ 256,3 aA
5	350 $\pm$ 70,7 aA	200 $\pm$ 151,2 bC
6	300 $\pm$ 141,4 bA	530 $\pm$ 198,2 aAB
7	300 $\pm$ 103,5 bA	530 $\pm$ 198,2 aAB

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

Os valores de Fibrinogênio do grupo I tiveram média de 275 mg/dL ($\pm$ 128,17) que ao final do período de armazenamento aumentou para 300 mg/dL ($\pm$ 103,51), não apresentando diferença estatística entre os diferentes momentos analisados. No grupo II ocorreu um aumento significativo de 300 ($\pm$ 166,90) para 525 ($\pm$ 198,21). Em geral houve diferença estatística entre os grupos 1 e 2 (Figura 8), em ambos os grupos houve alterações, mas dentro do intervalo de referência, segundo Thrall (2007).

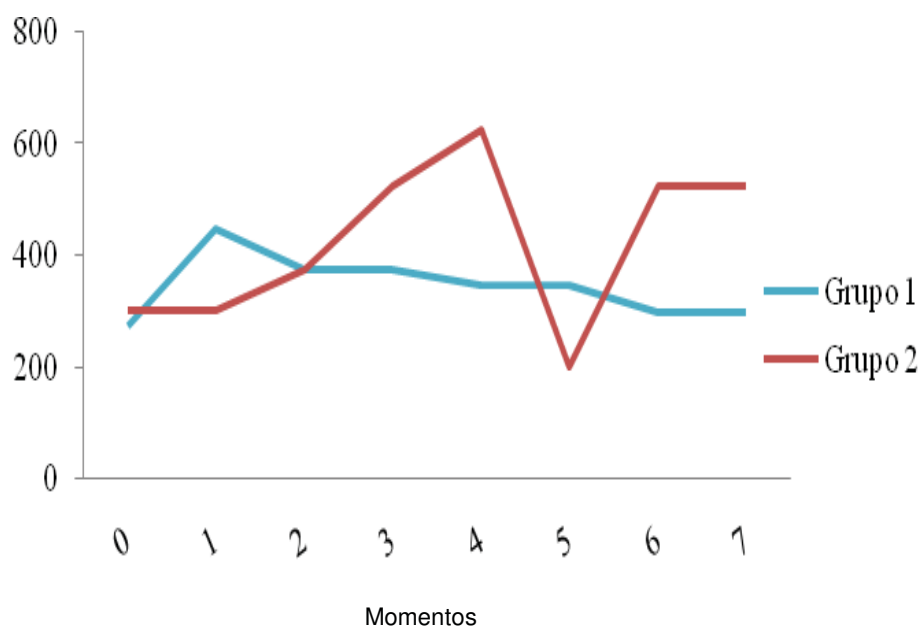


FIGURA 8. Valores médios de Fibrinogênio Plasmático (mg/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

4.1.7. Contagem Total de Leucócitos

Os valores médios e desvio padrão da Contagem Total de Leucócitos (μL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, proveniente de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) estão apresentados na tabela 9.

Houve diminuição dos valores médios de leucócitos para ambos os grupos experimentais. No primeiro momento, o grupo I se apresentou com o valor de $18.275 \mu\text{L}$ ($\pm 2.597,77$) e finalizou os 21 dias com $9.200 \mu\text{L}$ ($\pm 4.232,44$). O grupo II, no momento 0 com $14.137,5 \mu\text{L}$ ($\pm 1.953,71$) reduzindo para $11.700 \mu\text{L}$ (desvio padrão $\pm 956,09$) não houve diferença estatística entre os diferentes momentos. Os grupos sofreram uma redução nos seus valores médios durante os 21 dias, porém estiveram com seus valores em semelhança estatística significativa nos momentos 2 ao 6 (Figura 9).

TABELA 9. Médias $\pm$ Desvios-padrão da Contagem Total de Leucócitos (μL) de bezerros mestiços Nelore / Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

Momento	Grupo I	Grupo II
0	18.275,0 $\pm$ 2.597 aA	14.137,5 $\pm$ 1.953 bA
1	16.775,0 $\pm$ 3.915 aAB	13.850,0 $\pm$ 1.007 bA
2	14.325,0 $\pm$ 3.304 aBC	13.625,0 $\pm$ 804 aA
3	13.737,5 $\pm$ 972 aBC	13.162,5 $\pm$ 1.842 aA
4	12.825,0 $\pm$ 5.073 aCD	12.425,0 $\pm$ 1.079 aA
5	10.900,0 $\pm$ 5.474 aCDE	12.362,5 $\pm$ 769 aA
6	10.025,0 $\pm$ 3.341 aDE	11.687,5 $\pm$ 601 aA
7	9.200,0 $\pm$ 4.232 bDE	11.700,0 $\pm$ 956 aA

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P>0,05$).

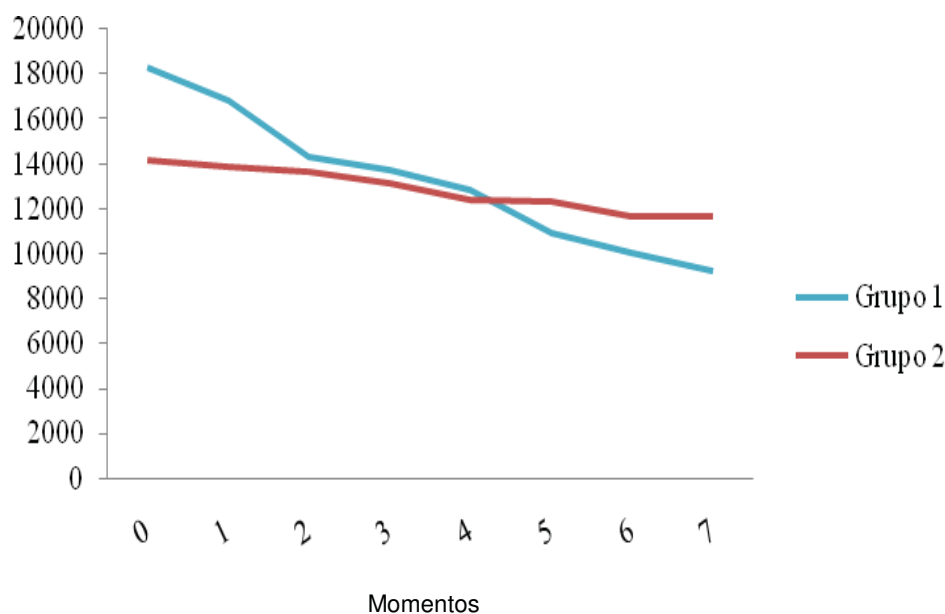


FIGURA 9. Valores médios da Contagem Total de Leucócitos (μL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

Estes resultados corroboram com Ribeiro Filho et al. (1992) e Souza et al. (2009), que verificaram que a diminuição da Contagem Total de Leucócitos pode estar ligada a degranulação dos polimorfonucleares, que são destruídos mais rapidamente que os linfócitos.

4.1.8. Concentração de Sódio Plasmático

As médias e desvio padrão da Concentração de Sódio Plasmático (Na^+) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) podem ser visualizadas na tabela 10.

Houve redução dos valores médios da concentração de Na^+ em ambos os grupos analisados. O grupo I apresentou no momento 0 a média de 201,5 mmol/L ($\pm 6,14$) e no momento 7 a média foi de 176,13 mmol/L ($\pm 2,07$). No grupo II houve uma redução de 183,88 mmol/L ($\pm 28,03$) para 159,88 mmol/L ($\pm 8,24$). Não houve diferença estatística durante os momentos da análise de ambos os grupos, mas ocorreu diferença estatística entre os grupos nos momentos 5 e 6 (Figura 10).

TABELA 10. Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores da Concentração de Sódio Plasmático (mmol/L) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

Momento	Grupo I	Grupo II
0	201,5 $\pm$ 6,14 aA	183,88 $\pm$ 28,03 aA
1	200,88 $\pm$ 16,48 aA	183,25 $\pm$ 15,73 aA
2	193,38 $\pm$ 20,26 aA	181,63 $\pm$ 8,37 aA
3	188,88 $\pm$ 9,88 aA	174,75 $\pm$ 9,10 aA
4	186,50 $\pm$ 4,58 aA	169,25 $\pm$ 15,21 aA
5	184,88 $\pm$ 8,08 aA	164,75 $\pm$ 16,80 bA
6	181,00 $\pm$ 9,91 aA	160,12 $\pm$ 27,55 bA
7	176,13 $\pm$ 2,07 aA	159,88 $\pm$ 8,24 aA

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

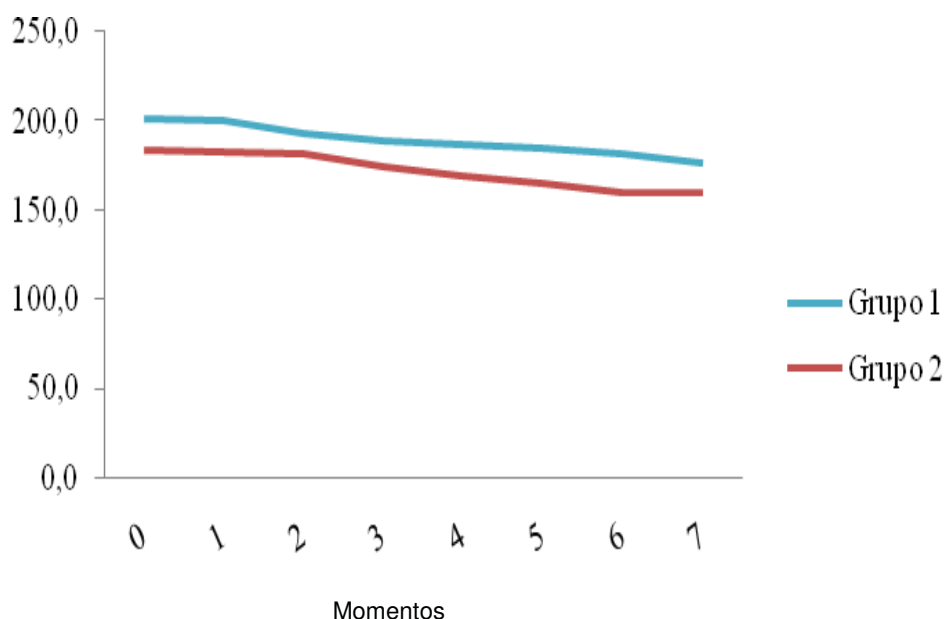


FIGURA 10. Valores médios da Concentração de Sódio Plasmático (mmol/L) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

4.1.9. Concentração de Potássio Plasmático

As médias e desvio padrão dos valores da Concentração de Potássio Plasmático (K^+) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) estão descritos na tabela 11.

Os grupos apresentaram um aumento durante o período de armazenamento. O grupo I no demonstrou o valor de 4,14 mmol/L ($\pm 0,78$) momento 0 e no momento 7 foi de 5,78 mmol/L ($\pm 0,82$). O grupo II iniciou com valor médio de 5,18 mmol/L ($\pm 0,51$), e não houve diferença entre os oito momentos. Ambos os grupos obtiveram valores médios estatisticamente semelhantes apenas nos momentos 3 ao 5 (Figura 11).

TABELA 11. Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores da Concentração de Potássio Plasmático (mmol/L) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

Momento	Grupo I	Grupo II
0	4,14 $\pm$ 0,78 bCD	5,18 $\pm$ 0,53 aA
1	4,02 $\pm$ 0,52 bD	5,04 $\pm$ 0,51 aA
2	4,26 $\pm$ 0,65 bCD	4,78 $\pm$ 0,24 aA
3	4,54 $\pm$ 0,40 aCD	4,88 $\pm$ 0,41 aA
4	4,79 $\pm$ 0,48 aBC	5,08 $\pm$ 0,34 aA
5	5,31 $\pm$ 1,20 aAB	5,09 $\pm$ 0,25 aA
6	5,62 $\pm$ 0,81 aA	5,10 $\pm$ 0,68 bA
7	5,78 $\pm$ 0,82 aA	5,21 $\pm$ 0,51 bA

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P>0,05$).

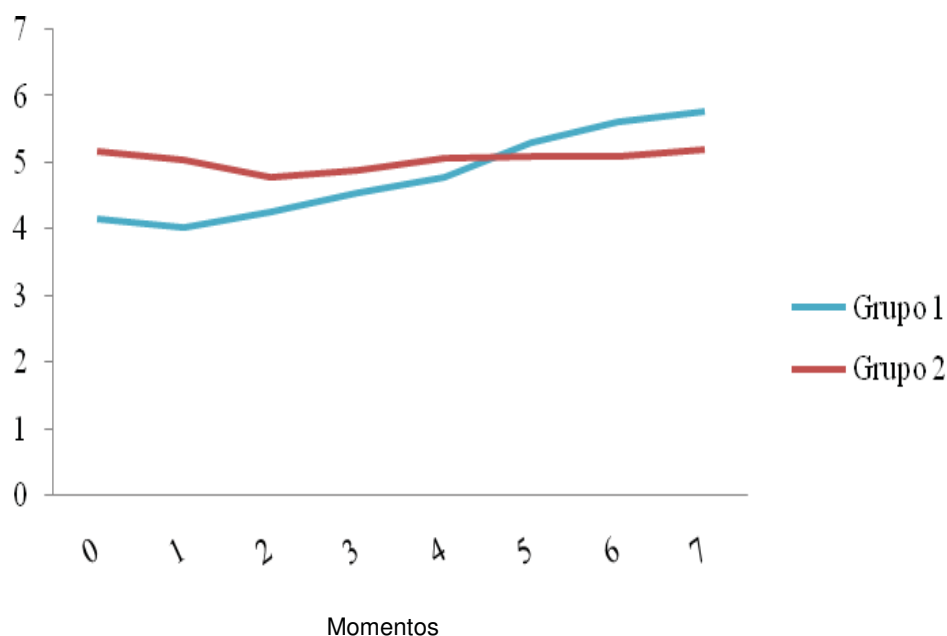


FIGURA 11. Valores da Concentração de Potássio Plasmático (mmol/L) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu SP, 2011.

As prováveis causas para aumento de potássio são hemólise, com liberação do K^+ para o plasma (MICHAEL, 1975; GANESH e KAMALAPUR, 1983, CAIRUTAS, 1985; RIBEIRO FILHO et al., 1992), diminuição do colesterol da membrana eritrocitária (GREENWALT, 1984) e falha na bomba de Na^+/K^+ (MICHAEL, 1975; LATHAM, 1982; FAGIOLO, 1986; HOGMAN et al., 1999).

O aumento de potássio extracelular indica diminuição da capacidade da membrana em manter a concentração de potássio no meio intracelular, ou indica hemólise (COSTA JÚNIOR, 2006).

4.1.10. Concentração de Lactato Plasmático

Os valores médios e desvio padrão da Concentração de Lactato Plasmático de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, proveniente de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) podem ser observados na tabela 12.

TABELA 12. Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores do Teor de Lactato Plasmático (mg/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

Momento	Grupo I	Grupo II
0	4,09 $\pm$ 5,34 bB	9,26 $\pm$ 5,23 aBC
1	3,95 $\pm$ 4,66 bB	9,08 $\pm$ 4,16 aBC
2	6,48 $\pm$ 6,18 aB	8,28 $\pm$ 2,75 aC
3	13,40 $\pm$ 5,34 aA	13,45 $\pm$ 3,67 aAB
4	15,29 $\pm$ 6,30 aA	17,18 $\pm$ 4,01 aA
5	14,13 $\pm$ 6,04 aA	14,62 $\pm$ 3,87 aA
6	14,54 $\pm$ 6,96 aA	15,02 $\pm$ 6,03 aA
7	16,47 $\pm$ 5,77 aA	15,96 $\pm$ 6,06 aA

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$).

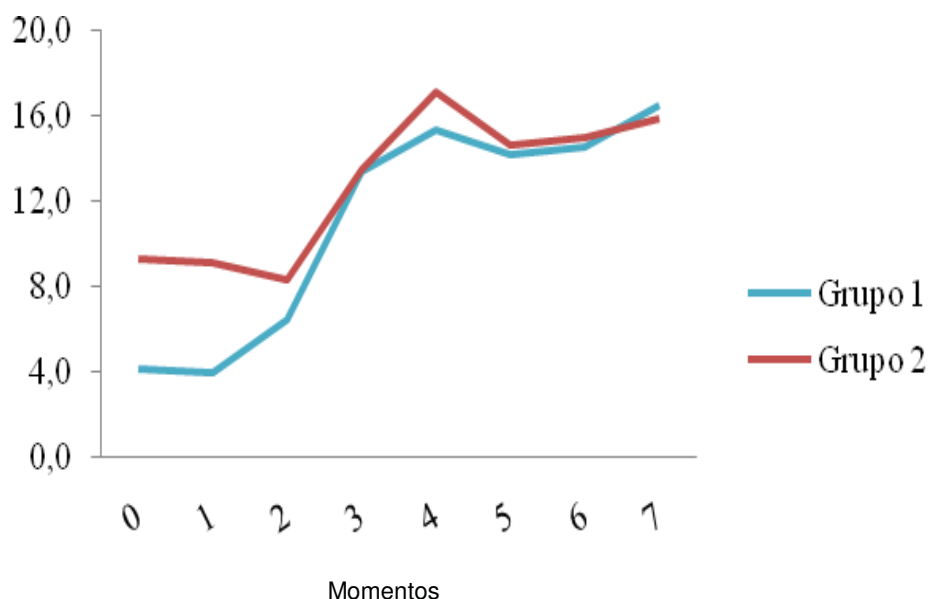


FIGURA 12. Valores médios do Teor de Lactato Plasmático (mg/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido) e grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011.

Houve um aumento da Concentração de Lactato Plasmático significativo estatisticamente nos dois grupos. O grupo I apresentou valor médio no momento 0 de 4,09 mg/dL ($\pm 5,34$) aumentando para 16,47 mg/dL ($\pm 5,77$) após 21 dias de conservação. No grupo II, o valor médio foi de 9,26 mg/dL ($\pm 5,23$) este valor médio elevou-se para 15,96 mg/dL ($\pm 6,06$) no momento sete. Nos dois primeiros momentos os grupos se diferenciaram e posteriormente não houve diferença estatística significativa (Figura 12).

Estes resultados corroboram com os encontrados por Costa Júnior (2006), que descreve o aumento devido ao metabolismo da glicose dentro da bolsa de transfusão com CPDA-1.

4.2. Segunda etapa experimental

4.2.1. Técnicas utilizadas para análise da segunda etapa experimental

4.2.1.1. Esfregaço Sanguíneo Corado (ESC)

O animal utilizado como doador apresentou uma parasitemia média de *Anaplasma marginale* de 30,60% no momento pré-colheita das bolsas de sangue utilizadas na primeira etapa experimental. Após 21 dias de armazenamento a carga parasitária média das bolsas foi de 18,75%, e no mesmo dia foi realizado o tratamento com Riboflavina associada à radiação ultravioleta. Após o procedimento a parasitemia média das bolsas reduziu para 15,26%.

A parasitemia demonstrou uma diminuição, quando analisada do momento da colheita até o momento de tratamento, possivelmente por efeito do armazenamento do sangue em condições desfavoráveis ao parasita. E após o tratamento a parasitemia reduziu novamente, sugerindo eficácia da ação da Riboflavina associada à radiação ultravioleta.

Após o tratamento, o sangue foi inoculado em bezerros experimentais, em uma alíquota de 50 mL e calculou-se novamente a parasitemia nos momentos zero, sete, 14 e 21.

De acordo com Vidotto e Marana (2001), esta técnica é muito específica, mas pouco sensível, podendo se tornar extremamente difícil e falha, ou seja, o parasita pode estar presente no animal e não estar presente na amostra utilizada para realização do exame.

4.2.1.2. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

No momento da colheita das bolsas de sangue parasitado utilizadas na primeira etapa experimental, o resultado da RIFI foi de 100% positivo. No momento de pré-tratamento, após 21 dias de armazenamento, o resultado obtido das bolsas foi de 50% positivo. E após o tratamento o tratamento Riboflavina associada à radiação ultravioleta resultado da RIFI foi de 100% negativo.

Portanto, podemos sugerir que o tratamento Riboflavina associada à radiação ultravioleta, pode ter sido eficaz para redução do parasita no sangue conservado em bolsas de transfusão.

4.2.1.3. Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR)

Amostras de sangue com concentração relativa $<0,1$ foram consideradas como reagentes positivas. As amostras com valores menores que o limiar de quantificação do teste de qPCR, foram consideradas negativas.

Nos momentos pré e pós tratamento com Riboflavina associada à ultravioleta, as amostras das bolsas de sangue analisadas apresentaram resultados 100% positivo. Estes resultados corroboram com os verificados por Buling et al. (2007) e Baneth et al. (2009), os quais confirmam a alta sensibilidade da técnica, que entretanto pode detectar fragmentos de DNA do parasita e/ou a presença de parasitas mortos na amostra.

4.2.2. Análise descritiva dos resultados obtidos durante a segunda etapa experimental

Na segunda etapa experimental, o grupo III foi formado por dois animais esplenectomizados, que receberam sangue não tratado com Riboflavina associado à radiação ultravioleta. Sendo que um animal, III.A, recebeu sangue RIFI e qPCR positivos e o outro, III.B, recebeu sangue RIFI negativo e qPCR positivo (Tabelas 13 e 14).

O animal III.A, no dia zero apresentou-se com VG de 29%, temperatura corpórea de 38,4°C positivo para qPCR com concentração relativa de 3,965 e não foi observado presença do hemoparasita *Anaplasma marginale* no ESC. A RIFI não foi determinada neste momento. Sete dias após inoculação, este animal apresentou um VG de 27% com temperatura de 37,7°C, parasitemia de 0,001%, positivo para qPCR com concentração de 9,222 e negativo na RIFI. Aos 14 dias, este animal sofreu uma redução do VG, sugerindo uma anemia com VG de 22%, temperatura de 38°C, parasitemia de 0,003%, qPCR positivo com concentração de 3,912 e RIFI negativa.

TABELA 13. Valores de Temperatura Corpórea (T°C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal III.A (Esplenectomizado, recebeu sangue não tratado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta, positivo para RIFI e qPCR). Botucatu – SP, 2011.

Animal	Data	T°C	VG%	RIFI	qPCR	Parasitemia%
III.A	dia 0	38,4	29	ND	3,965	0
	7 dias	37,7	27	Negativo	9,222	0,001
	14 dias	38	22	Negativo	3,912	0,003
	21 dias	38,6	20	Positivo	27,165	0

Após 21 dias da inoculação do sangue parasitado não tratado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta, o animal apresentava um VG de 20% com temperatura de 38°C, não foi observada a presença do hemoparasita *Anaplasma marginale* no ESC, qPCR positivo com concentração de 27,165 e RIFI positiva conforme apresentado na Tabela 13. Aos 20 dias pós inoculação o bezerro começou a apresentar sintomatologia clínica de apatia, anorexia, emagrecimento (peso inicial de 226,5 kg e peso aos 21 dias de 202,5 kg) e anemia, sugerindo que adoeceu, conforme o descrito por Ristic (1981); Alderink e Dietrich (1983); Barbet (1995); Taylor et al. (2009).

TABELA 14. Valores de Temperatura Corpórea (T°C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal III.B (Esplenectomizado, recebeu sangue não tratado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta, RIFI negativo e qPCR positivo). Botucatu – SP, 2011.

Animal	Data	T°C	VG%	RIFI	qPCR	Parasitemia%
III.B	dia 0	38,5	27	ND	0,001	0
	7 dias	38	25	Positivo	0,017	0,002
	14 dias	37,6	25	Negativo	0	0
	21 dias	39	27	Negativo	0,001	0,001

O bezerro III.B, no momento zero demonstrou ser negativo para qPCR com concentração relativa de 0,001 e não foi encontrado o hemoparasita no

ESC. A RIFI não foi determinada no momento zero. Na primeira semana após inoculação, o animal apresentou VG de 25%, temperatura corporal de 38°C, com parasitemia de 0,002%, qPCR negativo com concentração relativa de 0,017 e positivo para RIFI. Na segunda semana, aos 14 dias, seu VG permaneceu estável em 25%, temperatura de 37,6°C, não foi observado a presença do parasita *Anaplasma marginale* na amostra analisada, qPCR foi negativo com concentração de zero e RIFI negativa. Aos 21 dias, houve uma elevação do VG para 27%, temperatura de 39°C, com parasitemia de 0,001%, qPCR negativo com concentração relativa zero e RIFI negativa, evidenciando que embora tenha sido exposto ao parasita, não adoeceu possivelmente por ação adequada do sistema imunológico (Tabela 14).

Portanto, o sangue não tratado inoculado com Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) positiva para *Anaplasma marginale*, provocou a doença no bezerro e o sangue inoculado com RIFI negativa não produziu a doença.

O grupo IV foi formado por três animais não esplenectomizados, hígdos que receberam sangue tratado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta e RIFI negativa após tratamento (Tabelas 15, 16 e 17).

O animal IV.A, apresentou-se no dia zero com qPCR positivo de concentração relativa 0,960 e não foi observada a presença do parasita *Anaplasma marginale* no ESC. O exame de RIFI não foi determinado neste momento.

TABELA 15. Valores de Temperatura Corpórea (T°C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal IV.A (Hígido, recebeu sangue tratado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta). Botucatu – SP, 2011.

Animal	Data	T°C	VG%	RIFI	qPCR	Parasitemia%
IV.A	dia 0	37,7	33	ND	0,96	0
	7 dias	38,4	33	Negativo	0,035	0,001
	14 dias	38,8	31	Negativo	0,03	0
	21 dias	38	36	Negativo	1	0

Após sete dias da inoculação do sangue parasitado tratado, o animal apresentava um VG de 33%, temperatura corporal de 38,4°C, parasitemia de 0,001%, qPCR negativo de concentração relativa 0,035 e RIFI negativa. Na segunda semana após a inoculação, o seu VG reduziu para 31%, temperatura de 38,8°C, não foi observada a presença do parasita no ESC, qPCR negativo com concentração de 0,030 e RIFI negativa. Aos 21 dias posterior a inoculação, o animal apresentou uma elevação do VG para 36%, temperatura de 38°C, não foi observado a presença do *Anaplasma marginale* no ESC, qPCR positivo com concentração de 1 (um) e RIFI negativa (Tabela 15). Não apresentou sintomatologia clínica.

TABELA 16. Valores de Temperatura Corpórea (T°C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal IV.B (Hígido, recebeu sangue tratado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta). Botucatu – SP, 2011.

Animal	Data	T°C	VG%	RIFI	qPCR	Parasitemia%
IV.B	dia 0	38	32	ND	1,887	0
	7 dias	38,7	32	Negativo	2,046	0
	14 dias	37,8	27	Negativo	3,173	0,001
	21 dias	38,5	28	Negativo	5,946	0

O animal IV.B no momento zero, estava positivo para o qPCR com concentração de 1,887, não foi observada a presença do *Anaplasma marginale* no ESC e a RIFI não foi determinada. Após a primeira semana o VG deste animal era de 32%, sua temperatura corpórea era de 38,7°C, qPCR positivo de concentração relativa 2,046 e RIFI negativa. Na segunda semana pós inoculação do sangue tratado, o VG reduziu para 27%, temperatura de 37,8°C, parasitemia de 0,001%, qPCR positivo com concentração de 3,173 e RIFI negativa. Na terceira semana, o VG estava em 28%, temperatura corporal de 38,5°C, não foi observada a presença do hemoparasita na amostra, qPCR positivo com concentração de 5,946 e RIFI negativa, sem sintomatologia (Tabela 16).

TABELA 17. Valores de Temperatura Corpórea (T°C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal IV.C (Hígido, recebeu sangue tratado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta). Botucatu – SP, 2011.

Animal	Data	T°C	VG%	RIFI	qPCR	Parasitemia%
IV.C	dia 0	38	31	ND	0,41	0
	7 dias	38,5	30	Negativo	70,866	0
	14 dias	38,4	32	Negativo	0,001	0,001
	21 dias	38,2	31	Negativo	0,007	0

O animal IV.C no dia zero apresentou-se positivo para o exame de qPCR com concentração relativa de 0,410, não foi observado o parasita *Anaplasma marginal* no ESC. Não foi determinada a RIFI neste dia. Sete dias após a inoculação do sangue tratado, o animal apresentou VG de 30%, temperatura de 38,5°C, não foi encontrado o hemoparasita *Anaplasma marginale* no ESC, qPCR positivo com concentração relativa de 70,866 e RIFI negativo. No 14º dia houve um aumento no VG, 32%, sua temperatura se manteve estável com 38,4°C, parasitemia de 0,001% , seu qPCR foi negativo com 0,001 e RIFI negativa. No 21º dia seu VG estava em 31%, temperatura de 38,2°C, não foi observada a presença de hemoparasita no ESC, qPCR negativo de concentração 0,007 e RIFI negativa (Tabela 17). Animal clinicamente saudável.

Em geral, no grupo IV a RIFI permaneceu negativa e o VG se manteve estável em todos os momentos. Também não foi observada sintomatologia clínica. Considerando estes animais, como 100% normais em relação ao desenvolvimento da enfermidade.

Mesmo sendo qPCR positivos para *Anaplasma marginale*, estes não desenvolveram quadro clínico de anaplasmoze. O qPCR é uma técnica altamente sensível e específica que pode detectar até mesmo fragmentos de DNA do parasita ou parasitas mortos na amostra (BANETH et al., 2009).

O grupo V foi formado por três animais esplenectomizados que receberam sangue tratado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) negativo.

TABELA 18. Valores de Temperatura Corpórea (T°C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal V.A (Esplenectomizado, recebeu sangue tratado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta). Botucatu - SP, 2011.

Animal	Data	T°C	VG%	RIFI	qPCR	Parasitemia%
V.A	dia 0	38,4	30	ND	0,003	0
	7 dias	37,7	28	Negativo	1,728	0,001
	14 dias	37,8	23	Negativo	0,009	0,001
	21 dias	39	27	Negativo	0,008	0

O bezerro V.A, no dia zero encontrava-se negativo para qPCR com concentração relativa de 0,003 e no exame parasitológico, não foi observada a presença do *Anaplasma marginale*. A RIFI não foi determinada no dia zero. Aos sete dias pós inoculação do sangue tratado, este animal apresentou um VG de 28%, temperatura corporal de 37,7°C, parasitemia de 0,001%, seu qPCR foi positivo com concentração de 1,728 e RIFI negativa. Com 14 dias houve uma redução do valor do VG para 23%, com temperatura de 37,8°C, parasitemia de 0,001%, qPCR negativo com 0,009 de concentração relativa e RIFI negativa. Aos 21 dias após a inoculação, apresentou VG 27%, temperatura de 39°C, não foi observada a presença do hemoparasita *Anaplasma marginale* no ESC, seu qPCR foi negativo com concentração de 0,008 e RIFI negativa (Tabela 18). Animal sem sintomatologia clínica.

TABELA 19. Valores de Temperatura Corpórea (T°C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal V.B (Esplenectomizado, recebeu sangue tratado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta). Botucatu - SP, 2011.

Animal	Data	T°C	VG%	RIFI	qPCR	Parasitemia%
V.B	dia 0	38,3	30	ND	0,512	0
	7 dias	39	30	Negativo	0,001	0
	14 dias	38,5	28	Negativo	0,003	0
	21 dias	38,8	30	Negativo	0,115	0

O animal V.B apresentou-se positivo para o exame de qPCR com concentração relativa de 0,512, não foi observada a presença do *Anaplasma marginale* no ESC, e a RIFI não foi realizada. Na primeira semana após a inoculação do sangue tratado, o animal apresentou VG igual a 30%, temperatura de 39°C, ausência do hemoparasita no ESC, qPCR negativo com concentração 0,001 e RIFI negativa. Na segunda semana, o resultado de exame de VG foi de 28%, temperatura corpórea de 38,5°C, ausência do parasita no ESC, seu qPCR foi negativo com concentração de 0,003 e RIFI negativa. Na terceira semana o VG estava em 30%, temperatura de 38,8°C, positividade no qPCR com 0,115 de concentração relativa e RIFI negativa (Tabela 19). O bezerro apresentou-se clinicamente sadio em todos os momentos.

TABELA 20. Valores de Temperatura Corpórea (T°C), Volume Globular (VG), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) e Parasitemia de bezerro mestiço Nelore e Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos quatro momentos de análise da segunda etapa experimental, com intervalo de sete dias entre cada análise. Animal V.C (Esplenectomizado, recebeu sangue tratado com Riboflavina associada à radiação ultravioleta). Botucatu - SP, 2011.

Animal	Data	T°C	VG%	RIFI	qPCR	Parasitemia%
V.C	dia 0	38,5	33	ND	0	0
	7 dias	38,7	34	Negativo	0	0
	14 dias	38,5	33	Negativo	0	0
	21 dias	38,8	33	Negativo	0,001	0

O bezerro V.C apresentou qPCR negativo com concentração relativa zero e não foi notado a presença do hemoparasita *Anaplasma marginale* no momento zero. O exame de RIFI não foi realizado neste momento. Aos sete dias após a inoculação, o VG foi de 34%, com temperatura de 38,7°C, foi encontrado o hemoparasita no ESC, qPCR negativo com concentração relativa zero e o resultado da RIFI negativo. Aos 14 dias após a inoculação, o VG encontrava-se em 33%, temperatura corporal de 38,5°C, foi observada a presença do hemoparasita na amostra de ESC, negativo no exame de qPCR com concentração relativa zero e RIFI negativa. Com 21 dias após a inoculação o VG manteve-se em 33%, com temperatura de 38,8°C, não foi

notada a presença do hemoparasita na amostra de ESC, o qPCR foi negativo com concentração relativa zero e RIFI negativa (Tabela 20). O bezerro apresentou-se clinicamente saudável durante todo o período experimental.

Os bezerros esplenectomizados que receberam sangue tratado não apresentaram doença, porém detectou-se o DNA do parasita pelo qPCR. Desta maneira, podemos sugerir que neste grupo, o tratamento com Riboflavina associada à radiação ultravioleta foi eficiente, com 100% dos bezerros não apresentando sintomatologia da enfermidade.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Este estudo, diante das condições em que foi realizado, permitiu chegar as seguintes conclusões:

5.1. Primeira Etapa Experimental

O armazenamento do sangue bovino parasitado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, a 4 °C por 21 dias provocou:

- Redução dos valores médios para ambos os grupos na Contagem do Número Total de Hemácias, Concentração de Hemoglobina, Volume Globular, Proteína Plasmática Total, Contagem do Número Total de Leucócitos e do Sódio Plasmático.
- Aumento em ambos os grupos no Volume Corpuscular Médio, Teor de Lactato Plasmático e do Potássio Plasmático.
- Redução da carga parasitária de *Anaplasma marginale* no Esfregaço Sanguíneo Corado de 30,60% no início do período armazenamento passou para 18,75% após 21 dias.
- Redução na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) de 100% das amostras positivas no início de período de armazenamento, para 50% de amostras positivas após 21 dias.

As alterações ocorridas durante o armazenamento não inviabilizou que este sangue fosse transfundido nos bezerros receptores.

Após 21 dias de conservação os sangues, normal e parasitado com *Anaplasma marginale*, foram transfundidos para bezerros receptores e não foram observadas reações transfusionais adversas.

5.2. Segunda Etapa Experimental

O tratamento com Riboflavina associada a radiação ultravioleta provocou:

- A redução da carga parasitária de *Anaplasma marginale* no Esfregaço Sanguíneo Corado imediatamente após o tratamento de 15,26%.
- E a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) de 100% das amostras negativas.

O tratamento com Riboflavina associada à radiação ultravioleta não promoveu a completa eliminação do parasita.

Ocorreu uma inativação parcial do *Anaplasma marginale*, já que os bezerros receptores não desenvolveram a enfermidade.

O tratamento com Riboflavina associada à radiação ultravioleta determinou o diagnóstico de RIFI negativo em todos os bezerros inoculados.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERINK, F. J.; DIETRICH, A. **Economic and epidemiological implications of anoplasmosis in Texas beef cattle herds.** Texas Agricultural Experiment Station B-1426. Texas: A&M University, College Station, 1983. 16p.

ALMEIDA, M. B.; TORTELLI, F. P.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J. L. M., SOARES, M. P.; FARIAS, N. A. R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 237-242, 2006.

ALMOSNY, N. R. P.; SOARES, F. M. D.; CARDOSO, A.; VASCONCELOS, T. C.; MONTEIRO, A. O. Avaliação da deficiência eritrocitária da glicose-6-fosfato desidrogenase e valores hematológicos de eqüinos de salto. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.7, n.1, p. 14-16, 2000.

ARTILES, J.; LVES-BRANCO, F. P. J.; MARTINS, J. R.; CORREA, L. B.; SAPPER, M. F. M. Prevalência de Babesia bovis, B. bigemina e Anaplasma marginale no município de Bagé, R. S. **Revevista Brasileira Parasitologia Veteterinária**, v.4,n.2,p.179,1995.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F.S.; SHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of Ehrlichia canis in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v.12, n.136, 2009.

BARBET, A.F. Recent developments in molecular biology of anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.57, p.43-49, 1995.

BAUMGARTNER, W.; SCHLERKA, G.; FUMICZ, M. Seroprevalence survey for Anaplasma marginale-infection of Austrian cattle. **Journal Veteterinay Medicine** v.39, n.2, p.97-104, 1992.

BAZAN, C. T.; CAMARGO, G. O. A.; SANTOS, M. A. Babesiose bovina. **Revista eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 11, 2008.

BETTS, C.W.; CRANE, S.W. **Manual de terapêutica cirúrgica dos pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1988. 437 p.

BRINKMAN, M. H.; KERSTING, K. W. Bovine anaplasmosis: an overview. **Iowa State University Veterinarian**, v.52,n.1, p.34-38, 1990.

BRYANT, B. J.; KLEIN, G. M. D. Pathogen Inactivation: The Definitive Safeguard for the Blood Supply. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**: v.131,n.5, p.719-733, 2007.

BOSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. Y. DE VOS A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p.61-74, 1995.

CAIRUTAS, C.M. **Componentes e derivados do sangue para uso terapêutico**. Recife: Editora Universitária, 1985. 379p.

BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ASENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBACARRETERO, J.C.; FLORIN-CHISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*, **Veterinary Parasitology**, v.147, p.16–25, 2007.

CARDO, L. J.; SALATA, J.; MENDEZ, J.; REDDY, H.; GOODRICH, R. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. **Transfusion and Apheresis Science**, v.37, p. 131–137, 2007.

CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; CECI, L.; BUONAVOGLIA, C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 1-2, p. 107-114, 2007.

CARTANA, C.B. **Transfusão de sangue obtido de doadores anestesiados com quetamina e xilazinaou isofluorano em gatos hipovolêmicos**. 2010. 71f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

CORBIN. F.; 3rd. Pathogen inactivation of blood components: current status and introduction of an approach using riboflavin as a photosensitizer. **International Journal of Hematology**, v.76, suppl.2, p.253-257,2002.

COSTA JÚNIOR, J.D. **Avaliação do sangue total de cães armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

DALGLIESH, R. J.; STEWART, N. P. The use of tick transmission by *Boophilus microplus* to isolate pure strains of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* from cattle with mixed infections. **Veterinary Parasitology**, v. 13, n. 4, p. 317-323, 1983.

DIVERS, T.J. Blood Component Transfusions.**Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 21, ln. 3, p. 615-622, 2005.

FAGIOLO, E.; MORES, N.; PELLICCETTI, A. Biochemical parameters to asses viability of blood stored for transfusion use. **Folia Haematologica**, v.113, p.783-789, 1986.

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

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Winkins, 2000. p. 825-868.

FISCHER, T.H.; ROBBINS, M.E.; BODE, A.P.; NICHOLS, T.C.; BELLINGER, D.E. & SCHOENFISCH, M. H. Evidence that rehydrated, lyophilized red blood cells are sufficiently deformable for normal microcirculation transit. **Microscopy Research Technique**, v. 65, n.1-2, p. 62-71, 2004.

FREITAS, E.; MELO, M.N.; COSTA-VAL A.P.; MICHALICK, M.S.M. Transmisión of *Leishmania infantum* via blood transfusión in dogs: potencial for infection and importante of clinical factors, **Veterinary Parasitology**, v. 137,p. 159–167, 2006.

GANESH, T.; KAMALAPUR, P.N. Biological alterations in bovine blood stored in acid citrate dextrose (ACD) at 4 °C. **Indian Veterinary Journal**, v.60, p.439-444, 1983.

GEISE, W.; CONRAD, F.; HEINRICH, H. A. Protection of Stored Erythrocytes against Oxidative Stress and Insufficient Physiological Function by Enantiomers of α -Lipoic Acid. **Infusion Therapy and Transfusion Medicine / Infusionstherapie und Transfusionsmedizin**, v. 26, p. 26-32, 1999.

GODINE, C.; CAPRANI, A Effect of blood storage on erythrocyte/wall interactions: implications for surface charge and rigidity. **European Biophysics Journal**, v. 26, p.175–182, 1997.

GOODRICH, R.; HANSEN, E.; GILMOUR, D.; JESSER, R.; KEIL, S.; Goodrich, T. The use of pathogens in blood products. **Vox Sanguinis**, v.78, suppl.2, p.211-215, 2000.

GREENWALT, T.J.; BRYAN, D.J.; DUMASWALA, U.J. Erythrocyte membrane vesiculation and changes in membrane composition during storage in citrate-phosphate-dextrose-adenine-1. **Vox Sanguinis**, v.47, p.261-270,1984.

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

HAWKINS, J. A.; LOVE, J. N.; HIDALGO, R. J. Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: Tabanidae). **American Journal Veterinary Research**, v.43, n.4p.732-734,1982.

HERRERO, M. V.; PEREZ, E.; GOFF, W. L.; de ECHAIDE, T.; KNOWLES, D. P.; McELWAIN, T. F.; ALVAREZ, V.; ALVAREZ, A.; BUENING, G. M. Prospective study for the detection of *Anaplasma marginale* Theiler, 1911 (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Costa Rica. Ann. **The New York Academy Sciences**, p. 226-233, 1998.

HÖGMANN, C. F.; KNUTSON, F.; LÖÖF, H. Storage of whole blood before separation: the effect of temperature on red cell 2,3 DPG and the accumulation of lactate. **Transfusion**, v. 39, p. 492-497, 1999.

HORAK, I.G.; CAMICAS, J.-L.; KEIRANS, J.E. The Argasidae, Ixodidae and Nattallidae (Acari:Ixodida): a Word list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology**, v.28,n.1-4, p.27-54, 2002.

JAIN, N.C, **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febinger, 1993, p.133-158.

JAMES, M.A.; CORONADO, A.; LOPEZ, W. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. **Tropical Animal Health Production**, v.17, p.9-18, 1985.

JONGEJAN, F.; PERRY, B.D.; MOORHOUSE, P.D.S. Epidemiology of bovine babesiosis and anaplasmosis in Zambia. **Tropical Animal Health Production**, v.24, n.1, p.9-14, 1988.

JORGENSEN, W.K.; WEILGAMA, D.J.; NAVARATNE, M. Prevalence of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* at selected localities in Sri Lanka. **Tropical Animal Health Production**, v.24, p.9-18, 1992.

KERR, M.G. **Exames Laboratorias em Medicina Veteinária**. 2ºed. São Paulo: Roca, 2003. 436p.

KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R.; JESUS, E. F. de; SEMPREBOM, D. V. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.22, n.7, p. 747-752, 1987.

KESSLER, R. H., SCHENK, M. A. M. Tristeza Parasitária dos bovinos (TPB): conceito, etiologia, transmissão, epidemiologia, diagnóstico e controle. In: KESSLER, R. H., SCHENK, M. A. M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande: EMBRAPA – CNPGC, 1998, p. 48-67.

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

KIRK.R.W.; BISTNER, S.I. **Manual de procedimentos e tratamento de emergência em Medicina Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Manole, 1987.

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

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELENDEZ, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p.672–698, 2003.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E.F.; GARCIA-GARCIA, J.C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v. 129, p.285-300, 2004.

KOCAN, K. M.; LA FUENTE, J.; BLOUIN, E.F. Advances toward understanding the molecular biology of the Anaplasma-tick interface. **Frontiers Bioscience**, v.13, p.7032–7045, 2008.

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

KUMAR, V.; LOCKERBIE, O.; KEIL, S.D. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. **Photochemistry Photobiology**, v.80, p.15-21, 2004.

LACERDA, L. A. Transfusão sangüínea em veterinária: Desafios a vencer. In: GONZAÁLEZ, F. H. D.; SANTOS, A. P. (eds.). SIMPÓSIO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2., 2005, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005. p. 62-81, 2005.

LANEVSKI, A.; WARDROP, K. J. Principles of transfusion medicine in small animals. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 447-454, 2001.

LATHAM, J.T.; BOVE, J.R.; WEIRICH, F.L. Chemical and hematologic changes in stored CPDA-1 blood. **Transfusion**, v.22,p.158-159, 1982.

LOSOS, G. J.; Rickettsial Diseases – anaplasmosis. Infectious tropical diseases of domestic animals. New York: Churchill Livingstone Inc., 1986, p. 742-795.

MADRUGA, C. R.; AYCARDI, E.; KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M.; FIGUEREDO, G. R.; CURVO, J. B. E. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, em bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, n.9, p.1163-1168, 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 detection antibodies against *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**; v.20, n.3, p.109-112, 2000.

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

MICHAEL, J.M. DORNER, I. BURNS, D. KOHAYAGAWA, A. SCHENK, M.A.M. Potassium load in CPD-preserved whole blood and two types of packed red blood cells. **Transfusion**. V.15,n.2,p.144-149,1975.

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

OLIVEIRA, P. R. **Controle estratégico do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em bovinos de propriedades rurais dos municípios de lavras e Entre Rios de Minas – MG**. Belo Horizonte – MG, 1993. 97p

PATARROYO, S. **Inmunogenos y metodos de inmunizacion para el control de La anaplasmosis e babesiosis bovina**. Santiago: FAO, 1992

PRINCE, R.P.; ARMSTRONG, J.P.; McLEOD, D.A. Evaluation of citrate-phosphate-dextrose-adenine as a storage medium for packed canine erythrocytes. **Journal Veterinary International Medicine**, v.2, p.126-132, 1988.

REEVES, J. D.; SWIFT, B. L. Iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle. **Veterinary Medicine - Small Animal Clinical Sciences**, p. 911-914, 1977.

REICHMANN, P.; DEARO, A. C. O. Transfusão de sangue e seus derivados em grandes animais. **Seminário: Ciências Agrárias**, v. 22, n.2, p. 223-228, 2001.

RIBEIRO, M.F.B.; REIS, R. Exposição natural de bezerros em área endêmica de *Anaplasma marginale* de Minas Gerais. **Arquivo Escola Veterinaria UFMG**, 33:63-66, 1981b.

RIBEIRO FILHO, J.D.; ALMEIDA, C.T.; GONÇALVES, R.C.; KOHAYAGAWA, A.; CURI, P.R. Alterações hemogasométricas de sangue bovino durante a conservação em frascos de vidro com ACD e bolsas plásticas com CPDA-1, por 35 dias. **Veterinária e Zootecnia**, v.6, p.77-84, 1992.

RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D.; GUIMARÃES, A. M.; SCATAMBURLO, M. A.; MARTINS, N. E. Transmissão congênita da anaplasmosse bovina. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.47, n.3, 297-304, 1995.

RISTIC, M. Anaplasmosis. In: WEINMAN D., RISTIC, M. (Ed.). **Infectious blood diseases of Mman and animals**. New York: Academic Press, 1968. p. 473-536.

ROGERS, R. J.; DUNSTER, P. J. The elimination of *Anaplasma marginale* from carrier cattle by treatment with long acting oxytetracycline. **Australian Veterinary Journal**, 1984; 61 (9): 306.

SALIB, A. A.; DAWSON, R. B. Preservation of different types of buffalo leucocytes in ACD and CPD winth mrtabolic additives. **Acta Veterinária**. (Beograd), v.35, p.203-216, 1985.

SEGHATCHIAN, J.; SOUSA, G. Pathogen-reduction systems for blood components: The current position and future trends. **Transfusion and Apheresis Science**, v.35, n. 3, p. 189-196, 2006.

SOLHEIM, B. G.; SEGATCHIAN, J. Update on pathogen reduction technology for therapeutic plasma: Na overview. **Transfusion and Apheresis Science**, v.35, p.83-90, 2006.

SOUZA, R. S.; BARRETO, J. R.; SOUSA, I. K. F. CHAVES, D. F.; SOARES, H. F. BARROS, I. O.; MINERVINO, A. H. H.; ORTOLANI, E. L. Avaliação do sangue total de ovino armazenado em bolsas de sangue (CPDA-1) mantido sob refrigeração. **Ciência Animal Brasileira**, Supl 1, p.290-295, 2009.

RICHEY, E.J. Bovine anaplasmosis. **Howard - Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993. p.767-772.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Parasitologia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007.

THEILER, A..Report of the Government Veterinary Bacteriologist 1908–1909. In: THEILER, A. (Ed.). **Department of Agriculture, Union of South Africa**, pp. 6–64. 1910.

UILENBERG, G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. **Veterinary Parasitology**, v. 57, p.19-41, 1995.

UNNA, K.; GRESLIN, J.K. Studies on the toxicity and pharmacology of riboflavin. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 75, p.80-85, 1942.

VIDOTTO, O.; YAMAMURA, M. M.; ANDRADE, G. M.; BARBOSA, C. S.; FREIRE, R. L.; VIDOTTO, M. C. Ocorrência de *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos de bovinos leiteiros da região de Londrina, PR. Rev. **Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 4, n.2, p.184, 1995.

VIDOTTO, O.; BARBOSA, C. S.; ANDRADE, G. M.; MACHADO, R. Z.; da ROCHA M. A.; SILVA, S. S. Evaluation of a frozen trivalent attenuated vaccine against babesiosis and anaplasmosis in Brazil. **New York Academy of Sciences**, n.849, p.120-23, 1998.

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

WARDROP, J.; OWEN, T. J.; MEYERS, K.M. Evaluation of an additive solution for preservation of canine red blood cells. **Journal Veterinary Interne Medicine**, v. 8, n.4, p. 253-257, 1994.

WARDROP, K.J.; REINE, N.; BIRKENHEUER, A.; HALE, A.; HOHENHAUS, A.; CRAWFORD, C.; LAPPIN, M.R. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. **Journal Veterinary Interne Medicine**, v. 19, n. 1, p. 135-42, 2005.

WALKER, D. H.; DUMLER, L. S. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. **Emerging Infectious Diseases**, n.2, p.18-29, 1996.

VALERI, C.R.; VALERI, D.A.; GRAY, A. Viability and function of red blood cell concentrates stored at 4°C for 35 days in CPDA-1, CPDA-2 or CPDA-3. **Transfusion**, v.22, p.210-216, 1982.

ZAUGG, J. L. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. **American Journal of Veterinary Reserch**, v.46, n.3, p. 570-572, 1985.

ZAUGG, J. L.; KUTTLE, K. L. Bovine anaplasmosis: in utero transmission and the immunologic significance of ingested colostral antibodies. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, n.3, p.440-443, 1984.

Anexos

7. ANEXOS

ANEXO 1. Tabela referente à primeira etapa experimental. Valores de Contagem do Número Total de Hemácias (He), Concentração de Hemoglobina (Hb), Concentração do Volume Globular (VG), Contagem do Número Total de Leucócitos (Leucócitos), Determinação de Proteína Plasmática Total (PPT), Concentração de Fibrinogênio Plasmático de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido). Botucatu - SP, 2011.

Bolsa	Dia	He ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	VG (%)	PPT (g/dL)	Fibrinogênio (%)	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
1	0	5780	9,3	27	6,9	400	14400
1	1	5210	8,3	24	6,8	600	14500
1	2	5990	9,4	27	6,4	400	13800
1	3	4620	8,3	24	5,4	400	11500
1	4	4390	8,9	24	5,4	400	12200
1	5	4380	8,0	26	5,4	400	9100
1	6	4710	8,0	25	5,6	200	8900
1	7	4090	8,3	24	5,4	200	8100
2	0	6700	10,6	31	6,7	200	15900
2	1	6630	10,5	31	6,6	200	15700
2	2	5750	9,0	26	6,6	200	12700
2	3	4760	9,3	24	5,4	200	14000
2	4	4330	9,0	24	5,6	200	14300
2	5	4250	8,3	23	5,0	200	13900
2	6	4530	8,2	22	5,6	200	6100
2	7	4290	8,1	23	5,4	200	6400
3	0	7200	11,0	32	6,6	400	15600
3	1	6930	11,1	31	6,0	600	15200
3	2	6140	9,7	28	6,8	400	14600
3	3	7340	11,8	27	5,6	400	14000
3	4	4260	11,3	26	5,8	400	12700
3	5	4960	9,8	26	5,4	400	9700
3	6	5380	9,3	25	5,6	400	9600
3	7	5700	8,5	24	5,6	400	6400
4	0	4500	6,8	23	6,6	400	10900
4	1	4290	6,7	29	6,8	400	10100
4	2	4160	9,0	28	6,4	400	9300
4	3	5470	9,0	22	5,2	400	10400
4	4	2510	8,5	24	5,8	400	10900
4	5	4480	8,2	24	5,2	400	10800
4	6	4470	8,5	23	5,6	400	9100
4	7	2800	8,8	23	5,2	400	8300

Bolsa	Dia	He (x10⁶/μL)	Hb (g/dL)	VG (%)	PPT (g/dL)	Fibrinogênio (%)	Leucócitos (x10³/μL)
5	0	6900	10,0	30	6,6	200	20100
5	1	6690	10,7	31	6,8	400	20300
5	2	6050	9,5	27	6,4	400	15800
5	3	7190	9,3	24	5,2	400	15100
5	4	4060	9,6	24	5,8	200	10000
5	5	4710	8,5	25	5,2	200	8500
5	6	4690	8,3	24	5,6	400	9100
5	7	4850	8,5	23	5,2	400	8400
6	0	7900	11,0	35	6,2	200	22900
6	1	7760	12,6	36	6,0	400	22700
6	2	6600	10,5	30	6,6	400	16100
6	3	7010	10,9	25	5,4	400	13900
6	4	6830	9,8	24	5,8	400	12100
6	5	5800	8,5	25	5,4	400	9300
6	6	5050	8,7	25	5,8	400	10700
6	7	4050	8,9	23	5,4	400	9800
7	0	6900	10,9	30	6,7	200	20800
7	1	6780	11,0	31	6,8	600	20400
7	2	6890	11,0	32	6,6	400	18000
7	3	5010	11,0	28	5,2	400	17800
7	4	5970	9,9	27	5,6	400	16900
7	5	5020	8,6	25	5,2	400	12700
7	6	5660	8,5	24	5,6	200	12900
7	7	5350	8,5	24	5,2	200	12900
8	0	6400	10,0	29	6,6	200	25600
8	1	6200	10,0	28	6,0	400	15300
8	2	5980	9,5	27	6,8	400	14300
8	3	6010	10,1	23	5,2	400	13200
8	4	5680	10,4	24	5,8	400	13500
8	5	5390	9,6	25	5,6	400	13200
8	6	5290	9,3	24	5,8	200	13800
8	7	5850	9,3	25	5,2	200	13300

ANEXO 2. Tabela referente à primeira etapa experimental. Valores da Concentração sérica de Sódio (Na^+), Potássio (K^+) e Lactato, de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido). Botucatu - SP, 2011.

Bolsa	Dia	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)	Lactato (mg/dL)
1	0	195	4,0	5,3
1	1	194	4,2	5,23
1	2	190	4,9	6,91
1	3	190	5,1	14,11
1	4	187	5,5	16,36
1	5	185	5,6	13,61
1	6	180	6,0	18,38
1	7	178	6,1	16,06
2	0	214	4,3	4,6
2	1	213	4,3	4,52
2	2	194	4,1	6,64
2	3	182	4,4	12,61
2	4	180	4,8	16,55
2	5	179	5,2	12,24
2	6	178	5,3	14,73
2	7	171	5,4	12,71
3	0	220	4,4	4,45
3	1	218	4,3	4,37
3	2	195	4,3	6,37
3	3	178	4,4	17,1
3	4	176	4,7	16,71
3	5	176	5,4	17,93
3	6	172	5,4	6,31
3	7	172	6,0	15,38
4	0	178	4,1	4,31
4	1	178	4,0	4,23
4	2	178	4,3	7,35
4	3	178	4,5	14,24
4	4	173	4,5	17,93
4	5	172	4,9	13,94
4	6	160	5,0	13,51
4	7	152	5,0	15,89

Bolsa	Dia	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)	Lactato (mg/dL)
5	0	157	4,0	3,22
5	1	157	3,6	2,98
5	2	157	3,9	6,09
5	3	157	4,3	14,97
5	4	156	4,3	17,93
5	5	153	4,7	13,21
5	6	149	4,9	13,8
5	7	145	4,9	18,32
6	0	233	4,2	3,1
6	1	232	4,1	3,01
6	2	223	4,3	5,58
6	3	218	4,7	6,3
6	4	218	4,7	16,89
6	5	216	5,8	12,36
6	6	216	6,9	15,35
6	7	210	7,0	16,63
7	0	207	3,8	3,21
7	1	207	3,5	2,84
7	2	203	4,0	5,59
7	3	201	4,3	13,38
7	4	198	4,9	3,41
7	5	194	5,2	17,18
7	6	189	5,4	16,28
7	7	178	5,7	18,77
8	0	208	4,3	4,55
8	1	208	4,2	4,45
8	2	207	4,3	7,28
8	3	207	4,6	14,47
8	4	204	4,9	16,56
8	5	204	5,7	12,54
8	6	204	6,1	17,92
8	7	203	6,1	18,02

ANEXO 3. Tabela referente à primeira etapa experimental. Valores de Contagem do Número Total de Hemácias (He), Concentração de Hemoglobina (Hb), Concentração do Volume Globular (VG), Contagem do Número Total de Leucócitos (Leucócitos), Determinação de Proteína Plasmática Total (PPT), Concentração de Fibrinogênio Plasmático de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo II (esplenectomizados). Botucatu - SP, 2011.

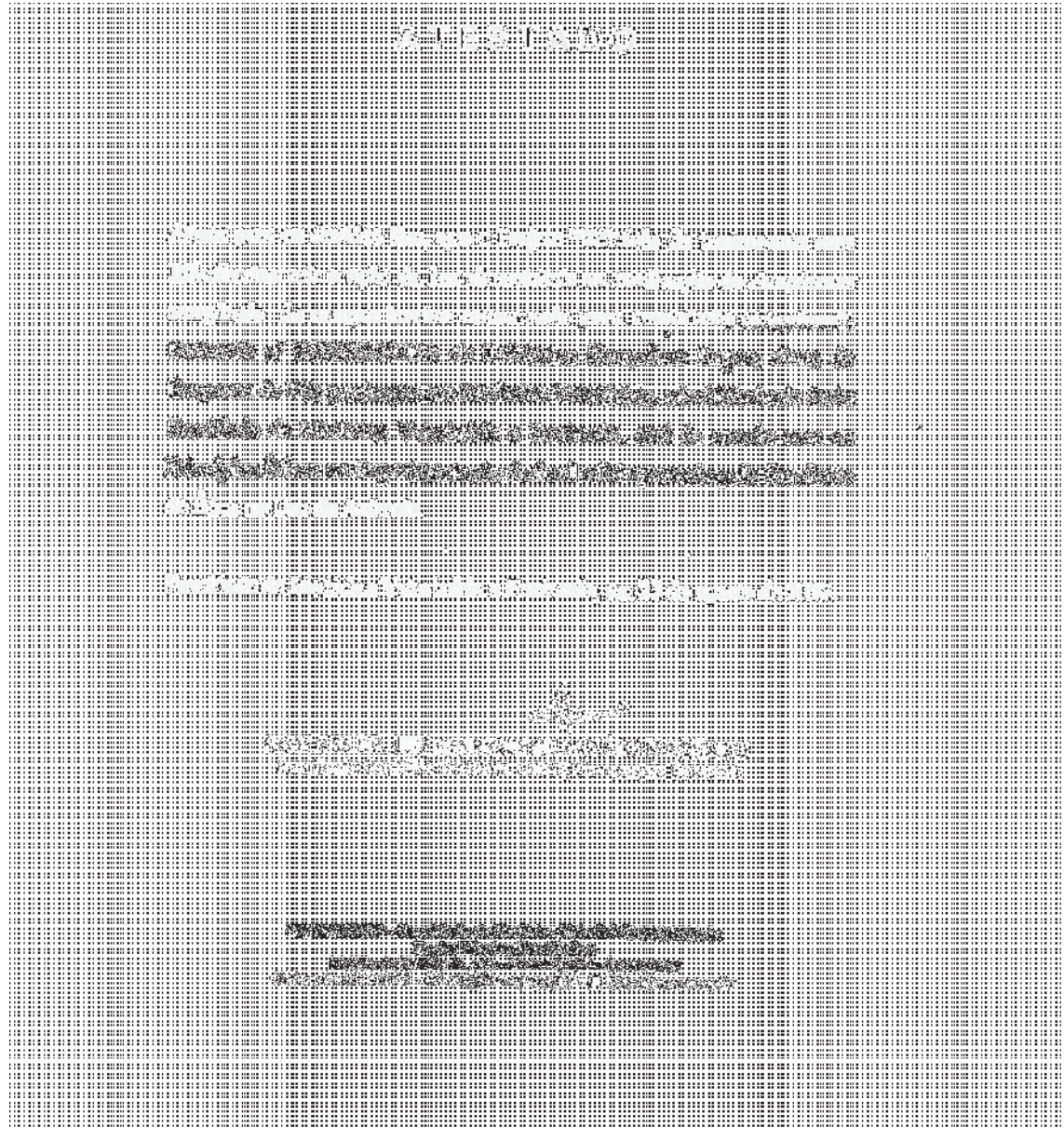
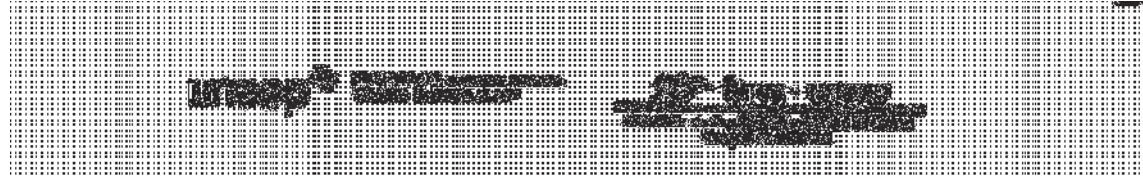
Bolsa	Dia	He ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	VG (%)	PPT (g/dL)	Fibrinogênio (%)	Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
1	0	4800	9,0	12	9,0	200	14.100
1	1	4670	8,6	12	8,6	200	14.200
1	2	3220	3,8	11	8,6	400	14.000
1	3	3310	4,5	12	5,4	600	14.900
1	4	3770	3,8	10	5,8	600	13.400
1	5	3800	3,5	14	5,2	200	10.200
1	6	3790	3,4	13	5,4	200	10.500
1	7	3900	3,5	13	6,0	600	10.600
2	0	5100	7,0	15	8,8	400	14.200
2	1	4940	6,8	13	8,6	200	14.000
2	2	4380	5,3	15	8,6	400	13.800
2	3	3600	4,7	11	5,2	600	13.200
2	4	3030	4,3	10	5,8	400	11.200
2	5	3140	3,8	10	5,6	200	13.400
2	6	3740	3,7	10	5,8	800	12.300
2	7	3390	3,4	9	5,8	400	12.600
3	0	6050	8,0	23	8,8	400	13.000
3	1	6000	7,9	22	8,6	200	12.900
3	2	4400	5,2	15	8,4	400	12.600
3	3	4800	3,6	11	5,2	600	11.100
3	4	4150	5,0	8	5,8	400	11.400
3	5	4580	3,4	11	5,4	200	11.000
3	6	4740	3,6	10	5,4	400	11.600
3	7	4600	2,0	10	5,8	600	11.700
4	0	5800	8,3	22	8,6	200	15.200
4	1	5730	8,1	21	8,4	200	14.600
4	2	3810	4,5	13	8,6	400	14.200
4	3	3650	3,5	10	5,2	400	14.000
4	4	3180	3,5	9	5,6	800	12.600
4	5	2920	3,6	12	5,4	200	12.600
4	6	3010	3,6	11	5,6	800	10.600
4	7	2790	3,4	11	5,8	600	10.200

Bolsa	Dia	He (x10⁶/μL)	Hb (g/dL)	VG (%)	PPT (g/dL)	Fibrinogênio (%)	Leucócitos (x10³/μL)
5	0	4800	6,0	17	8,5	400	13.800
5	1	4570	5,8	16	8,6	600	13.300
5	2	5010	6,1	18	8,4	400	13.100
5	3	4820	3,8	12	5,2	400	12.400
5	4	3720	9,3	11	5,2	600	12.300
5	5	3890	3,4	10	5,4	200	10.700
5	6	3910	3,6	10	5,4	400	11.600
5	7	3840	3,6	9	5,8	400	11.200
6	0	5000	6,8	19	8,6	200	12.800
6	1	4860	6,6	18	8,8	400	12.400
6	2	4280	5,2	15	8,6	200	11.900
6	3	4530	4,4	12	5,4	400	11.500
6	4	4230	3,4	10	5,8	800	11.200
6	5	3170	3,9	11	5,6	200	13.700
6	6	4880	4,0	11	5,6	600	11.100
6	7	4200	2,5	10	5,8	600	10.900
7	0	6100	8,0	22	8,6	200	14.200
7	1	6000	7,9	22	8,8	400	14.000
7	2	4970	7,4	18	8,8	400	14.000
7	3	4370	5,3	12	5,4	600	13.700
7	4	4420	3,8	9	5,8	800	13.400
7	5	3290	4,0	13	5,6	200	13.500
7	6	4820	4,1	12	5,8	800	12.500
7	7	3340	3,9	12	5,8	600	12.800
8	0	6300	9,0	24	8,7	400	15.800
8	1	6220	9,1	23	8,6	200	15.400
8	2	5280	6,4	19	8,6	400	15.400
8	3	4910	3,2	10	5,4	600	14.500
8	4	4170	3,4	9	5,4	600	13.900
8	5	2730	3,4	10	5,4	200	13.800
8	6	2670	3,6	9	5,6	200	13.300
8	7	2870	3,6	9	5,8	400	13.600

ANEXO 4. Tabela referente à primeira etapa experimental. Valores da Concentração sérica de Sódio (Na^+), Potássio (K^+) e Lactato, de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo II (esplenectomizado). Botucatu - SP, 2011.

Bolsa	Dia	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)	Lactato (mg/dL)
1	0	200	5,7	20,05
1	1	200	5,4	19,07
1	2	220	5,7	6,5
1	3	192	5,3	8,84
1	4	172	5,0	18,57
1	5	165	5,0	13,12
1	6	145	4,4	18,62
1	7	142	4,3	18,34
2	0	163	4,6	8,8
2	1	163	4,5	8,7
2	2	206	5,4	9,76
2	3	201	5,8	12,7
2	4	192	5,6	17,56
2	5	189	5,3	16,39
2	6	187	5,2	16,6
2	7	184	5,9	18,68
3	0	167	5,1	9,21
3	1	166	4,9	9,19
3	2	190	5,1	9,82
3	3	182	5,3	12,37
3	4	174	5,3	16,88
3	5	174	5,2	13,06
3	6	171	5,4	13,12
3	7	167	5,7	14,61
4	0	159	4,4	9,3
4	1	159	4,3	9,22
4	2	167	4,5	10,19
4	3	166	4,4	16,22
4	4	166	4,9	14,8
4	5	156	5,1	18,79
4	6	145	5,3	16,69
4	7	144	5,2	13,74

Bolsa	Dia	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)	Lactato (mg/dL)
5	0	186	4,8	9,22
5	1	185	4,7	9,18
5	2	149	3,9	7,89
5	3	150	4,1	17,97
5	4	153	4,3	18,15
5	5	151	4,6	14,54
5	6	163	4,7	12,58
5	7	163	4,8	14,91
6	0	197	5,5	7,32
6	1	196	5,4	7,29
6	2	178	4,8	9,8
6	3	173	5,0	13,98
6	4	169	5,1	18,65
6	5	155	4,9	10,26
6	6	154	4,9	13,58
6	7	161	5,0	13,57
7	0	205	5,9	5,62
7	1	204	5,8	5,51
7	2	151	4,1	6,34
7	3	143	4,1	6,92
7	4	146	4,6	18,1
7	5	147	4,7	17,99
7	6	141	4,8	10,21
7	7	144	4,8	18,6
8	0	194	5,4	4,55
8	1	193	5,3	4,46
8	2	192	4,7	5,86
8	3	191	5,0	18,6
8	4	182	5,8	14,72
8	5	181	5,9	12,78
8	6	175	6,1	18,72
8	7	174	6,0	15,21

ANEXO 4. Atestado da Comissão de Ética no Uso de Animais.

Trabalho científico

Trabalho a ser enviado para a revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Estudo das alterações hematológicas em sangue bovino parasitado com *Anaplasma marginale* conservado para transfusão sanguínea.

Lopes, L.G.¹, Reis, R.O.², Lopes, R.S.³, Pires, P.P.⁴, Araújo, F.R.⁵, Vinholi, S.R.⁵

ABSTRACT. - Lopes, L.G., Reis, R.O., Lopes, R.S., Pires, P.P., Vinholi, S.R. 2011. [Study of hematological changes in bovine blood parasitized with *Anaplasma marginale* maintained for blood transfusion.] Estudo das alterações hematológicas em sangue bovino parasitado com *Anaplasma marginale* conservado para transfusão sanguínea. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Departamento de Clínica Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior- SP. CEP: 18.618-000. Brazil. E-mail: leizinara2@hotmail.com

The objective of this study was to evaluate hematological changes in bovine blood from healthy and *Anaplasma marginale* infected animals after a 21day storage period in plastic bags with Citrate-Phosphate-Dextrose-Adenine (CPDA-1) and also to evaluate the effect of Riboflavin associated with ultraviolet radiation (UV) on the inactivation of the hemoparasite. In the first experimental phase, the number of Erythrocytes (RBC) and Leukocytes, Hemoglobin (Hb), Globular Volume (GV), Mean Corpuscular Volume (MCV), Total Plasma Protein (TPP), Fibrinogen, Sodium (Na⁺), Potassium (K⁺) and Lactate was determined every 3 days for 21 days. For both groups, reduction of the average values of He, Hb, PCV, PPT, and Na⁺ leukocytes, and increased MCV, K⁺ and lactate. However, not unfeasible that this blood was transfused in calves receptors.

INDEX TERMS: *Anaplasma marginale*; Calves; Ultraviolet radiation; Riboflavin; blood transfusion.

RESUMO. – O estudo teve como objetivo verificar possíveis alterações hematológicas, que ocorrem no sangue bovino de animais hígidos e parasitados com *Anaplasma marginale*, conservado por 21 dias em bolsas plásticas contendo Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina (CPDA-1). Os animais foram divididos em dois grupos. O grupo I foi formado por bolsas plásticas contendo sangue proveniente de bovinos clinicamente saudáveis e o grupo II por bolsas plásticas contendo sangue proveniente de bovinos parasitados por *Anaplasma marginale*. Foram determinados para ambos os grupos a Contagem Total de Hemácias (He), Concentração de Hemoglobina (Hb), Volume Globular (VG), Concentração do Volume Corpuscular Médio (VCM), Proteína Plasmática Total (PPT), Fibrinogênio, Contagem Total de Leucócitos (Leu), Teor de Sódio (Na⁺), Potássio (K⁺) e Lactato Plasmático a cada três dias durante 21 dias. Para ambos os grupos, ocorreu redução dos valores médios de He, Hb, VG, PPT, Leucócitos e Na⁺; e aumento no VCM, K⁺ e Lactato. Entretanto, não inviabilizou que este sangue fosse transfundido nos bezerros receptores.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Anaplasma marginale*; Bezerros; Radiação ultravioleta; Riboflavina; Transfusão sanguínea.

1-Departamento de Clínica Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior- SP, 18.618-000, Brasil. Leizinara Gonçalves Lopes: leizinara2@hotmail.com

2-Departamento de Clínica Veterinária. FMVZ - UNESP - Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior- SP, 18.618-000, Brasil. Rafael de Oliveira Reis: rafaelreis_vet@hotmail.com

3-Departamento de Clínica Veterinária. FMVZ - UNESP -Campus de Botucatu. Distrito de Rubião Júnior- SP, 18.618-000, Brasil. Raimundo Souza Lopes: souzalopes@fmvz.unesp.br

4-Embrapa Gado de Corte. BR 262 km 4 - Caixa Postal 154. CEP 79002-970 - Campo Grande, MS. Pedro Paulo Pires: pedropaulo@cnpqc.embrapa.br

5- Embrapa Gado de Corte. BR 262 km 4 - Caixa Postal 154. CEP 79002-970 - Campo Grande, MS. Flávio Ribeiro Araújo: flabio@cnpqc.embrapa.br

6-Pet Lab Laboratório Veterinário. Rua Amazonas, 702-Monte Castelo. Campo Grande – MS, 79010-060, Brasil. Silvia Regina Vinholi: svinholi@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A estocagem sanguínea para transfusão é praticada em medicina humana, desde que a primeira solução preservativa, o ácido citrato dextrose foi observada em 1943. Desde então muitos trabalhos tem sido realizados na tentativa de desenvolver meios para manter a viabilidade e capacidade funcional do sangue estocado por longos períodos. A estocagem em soluções anticoagulantes objetiva manter a viabilidade e função de cada constituinte sanguíneo; prevenir alterações físicas prejudiciais a seus componentes e evitar proliferação bacteriana (TAYLOR et al., 2009).

O sangue pode ser utilizado logo após a colheita ou conservado a temperatura de 1 a 6°C para uso posterior (CHIARAMONTE, 2004). Quando o sangue conservado é transfundido supõe-se que os hemocomponentes do sangue estejam viáveis, ou seja, sem alterações funcionais, morfológicas e bioquímicas (OU et al., 1975).

Segundo LANEVSKI & WARDROP (2001), a heparina e o citrato são anticoagulantes que não contribuem para a conservação das hemácias durante um armazenamento em longo prazo e o sangue total coletado com esses anticoagulantes deve ser utilizado dentro de 24 horas. Os conservantes mais comumente utilizados são o ácido citrato dextrose (ACD), citrato fosfato dextrose (CPD e CPD-2) e o citrato fosfato dextrose adenina (CPDA-1), no qual é adicionado dextrose, fosfato e adenina para favorecer a viabilidade das hemácias, permitindo seu armazenamento por três a cinco semanas, dependendo do conservante utilizado.

O estudo realizado por RIBEIRO FILHO et al. (1992), com sangue armazenado em tubos de vidro contendo ACD e sangue armazenado em bolsas plásticas com CPDA-1. Baseado nos achados deste experimento, o sangue bovino total pode ser satisfatoriamente conservado em frascos de vidro contendo ACD por 14 dias, e no máximo por 21 dias. Em bolsas plásticas com CPDA-1, conserva satisfatoriamente por 28 dias, e no máximo por 35 dias.

A viabilidade do sangue estocado está na dependência da técnica de coleta, do anticoagulante, da temperatura de estocagem e dos parâmetros bioquímicos (TAYLOR et al., 2009; LOPES et al., 1995; HOGMAN et al., 2002). Assim, é muito importante a adequada conservação do sangue e seus derivados utilizados na transfusão sanguínea (REICHMANN & DEARO, 2001).

Existe um risco muito elevado de transmissão de agentes infecciosos, devido ao longo período de incubação e persistência subclínica em animais infectados, existindo assim a probabilidade de permanecer viável no sangue estocado (FREITAS et al., 2006). Os riscos associados com a transfusão de sangue incluem a possibilidade de transmissão de doenças através do sangue, como por exemplo, a anaplasiose e babesiose (FELDMAN et al., 2000).

Este estudo teve como objetivo, verificar as alterações hematológicas e bioquímicas que ocorrem no sangue bovino de animais saudáveis, comparando com as alterações do sangue de animais parasitados com *Anaplasma marginale* quando conservado em bolsas plásticas contendo CDPA-1, a 4°C por 21 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte (EMBRAPA), Campo Grande - MS. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório Clínico Veterinário "Profa. Agumi Kohayagawa" e de Enfermidades Parasitárias "Prof. Mauro Rodrigues de Oliveira" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, "Julio de Mesquita Filho", Campus Botucatu – SP.

A EMBRAPA Gado de Corte disponibilizou os bovinos mestiços Nelore/Caracu, com idades entre oito a 12 meses, de ambos os sexos, com peso médio de 200 kg.

Dois bezerros foram utilizados neste trabalho. Sendo um bezerro clinicamente saudável e um bezerro que foi inoculado com uma cepa de *Anaplasma marginale* de alta patogenicidade, contendo $3,2 \times 10^7$ eritrócitos infectados com *A. marginale* (Origem Pernambuco – Zona da Mata), fornecida pela EMBRAPA, Campo Grande, MS.

Os animais foram mantidos em uma área de isolamento, onde recebiam uma vez ao dia ração produzida na EMBRAPA Gado de Corte, volumoso duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Após um período de adaptação de 20 dias, foi feita a cirurgia de esplenectomia total no animal do que foi inoculado com uma cepa contendo $3,2 \times 10^7$ eritrócitos infectados por *Anaplasma marginale*. Esta intervenção cirúrgica segundo Vidotto & Marana (2001) deixa os bezerros mais susceptíveis à infecção por *Anaplasma marginale*.

As amostras foram colhidas em ambos os animais, através de punção da veia jugular externa com os animais em estação, contidos adequadamente. O local para a colheita foi preparado com tricotomia e anti-sepsia. Foram colhidas oito bolsas de sangue plásticas com conservante do tipo Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina-1 (CDPA-1) e mantidos refrigerados a uma temperatura de 1 a 4° C durante 21 dias. Durante a colheita o sangue foi movimentado constantemente de modo que o mesmo fosse apropriadamente homogeneizado. Para facilitar à colheita a bolsa plástica foi posicionada em um nível mais baixo de modo que a força da gravidade ajudasse no processo.

O grupo I foi composto por oito bolsas plásticas contendo sangue de bovino clinicamente saudável. O grupo II foi formado por oito bolsas plásticas contendo sangue proveniente de bezerro parasitado com *Anaplasma marginale*, 17 dias após a inoculação. Em ambos os grupos foram colhidas amostras sanguíneas das bolsas conservadas em geladeira, a cada três dias durante o período de 21 dias de armazenamento. Foram realizadas as seguintes exames laboratoriais: Contagem Total de Hemácias (He), Concentração de Hemoglobina (Hb), Concentração do Volume Globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Contagem Total de Leucócitos (Leucócitos), Determinação de Proteína Plasmática Total (PPT), Concentração de Fibrinogênio Plasmático e Concentração sérica de Sódio (Na^+), Potássio (K^+) e Lactato.

A Contagem Total de Hemácias (He), Concentração de Hemoglobina (Hb) e Contagem Total de Leucócitos, foi realizada a pelo contador automático de células sanguíneas CELM®, CC-500. A determinação da Concentração do Volume Globular (VG) foi feita seguindo o método de microhematócrito, conforme descrito por Weiss e Wardrop (2010). O Volume Corpuscular Médio (VCM) foi obtido por um cálculo aritmético a partir do hematócrito e da contagem de hemácias da amostra, como descrito por Kerr (2003). Determinação de Proteína Plasmática Total (PPT) por refratometria segundo Feldman (2000). Para determinação do Teor de Fibrinogênio Plasmático, foi utilizado o método da precipitação pelo calor, descrito por Thrall (2007). A determinação da concentração de Sódio (Na^+) e Potássio (K^+) plasmáticos foi realizada pelo método de fotometria de chama utilizando o kit da CELM®, no fotômetro FC-280. A concentração de Lactato plasmático foi obtida pela dosagem no analisador bioquímico com kit da KATAL®, no aparelho Cobas Mira Plus da Roche®.

A estatística foi realizada análise de medidas repetidas (Two Way Repeated measures ANOVA) comparando os dois grupos no decorrer dos oito momentos considerando 5% de nível de significância. Também foi realizado para comparar as médias o Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu. Protocolo n° 97/2009 – CEUA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios obtidos na Contagem Total de Hemácias (He) ($\times 10^6/\mu\text{L}$), nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) estão descritos nas tabelas 3 e 4.

Observou-se uma redução ($P > 0,05$) dos valores médios das hemácias durante o período de armazenamento por 21 dias, para ambos os grupos. O grupo I iniciou com o valor médio de $6,55 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($\pm 1,03$), reduzindo após os 21 dias para $4,60 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($\pm 1,01$). O grupo II, no momento zero apresentou o valor médio de $5,49 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($\pm 0,62$), reduzindo para $3,61 \times 10^6/\mu\text{L}$ ($\pm 0,63$) no momento sete. Ambos os grupos após o período de 21 dias, apresentaram valores médio abaixo dos valores de referência de acordo com a tabela 1. Na análise de variância houve efeito significativo para grupo e para momento ($P < 0,05$), porém não houve efeito da interação ($P > 0,05$).

A diminuição do número de hemácias ocorreu devido a hemólise que pode ser observada no plasma das bolsas durante o período de armazenamento, este achado também foi demonstrado por Ribeiro Filho et al. (1992), Almosny et al. (2000), Fisher et al. (2004), Bazan (2008) e Souza (2009).

As médias dos valores da Concentração de Hemoglobina (Hb), (g/dL), nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) podem ser visualizadas nas tabelas 3 e 4.

Neste estudo ocorreu uma redução dos valores médios de hemoglobina para ambos os grupos. O grupo I apresentou uma concentração de hemoglobina de 9,95 g/dL ($\pm 0,56$) no primeiro momento, reduzindo sem diferença significativa para 8,61 g/dL ($\pm 0,41$) aos 21 dias. O grupo II iniciou com o valor médio já abaixo do valor de referência, no primeiro momento foi de 7,76 g/dL ($\pm 2,36$) e apresentou uma significativa redução aonde, ao final do período de armazenamento, chegou a atingir 3,24 g/dL ($\pm 2,58$). Houve diferença estatística entre os grupos em todos os momentos de análise ($P > 0,05$).

Esta redução no valor médio da Hb, pode ser justificada pela hemólise observada durante o período de armazenamento em bolsas de transfusão por 21 dias, a conservação influencia a fragilidade osmótica das hemácias, favorecendo a lise e liberação de hemoglobina plasmática, estes resultados corroboram com o encontrado por Ribeiro Filho et al. (1992), Almosny et al. (2000), Fisher et al. (2004) e Souza (2009).

Os valores médio do Volume Globular (VG) (%), nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do Grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) (Tabelas 3 e 4).

Ambos os grupos apresentaram uma redução entre o primeiro e o último momento do experimento. O grupo I apresentou média de variação no primeiro momento de 29,62% ($\pm 1,36$), reduzindo para 23,62% ($\pm 2,13$). No grupo II, o VG já apresentava-se diminuído desde o primeiro momento, com 19,25% ($\pm 1,25$) reduzindo para 10,38% ($\pm 6,69$). Houve diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$).

De acordo com Kessler et al. (1998), nos casos de anaplasmoses, o volume globular pode decrescer em mais de 50% em relação ao valor normal para bovinos. Podendo atingir valores menores que 10%. O número de células eliminadas não é proporcional ao número de células parasitadas, devido à destruição imunomediada de eritrócitos não parasitados pelas células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) e por imunoglobulinas (FELDMAN et al., 2000).

Provavelmente a redução ocorreu devido as lesões de estoque das hemácias conservadas em bolsas para transfusão contendo CPDA-1 e devido a hemólise como relatam Ribeiro Filho et al. (1992), Almosny et al. (2000), Fisher et al. (2004) e Souza (2009).

Os valores médio do Volume Corpuscular Médio (VCM) (fL), nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do Grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) estão descritos nas tabelas 3 e 4.

Os resultados obtidos no grupo I, foram de 45,5 fL ($\pm 5,9$) no momento 0 sofrendo um discreto aumento até 54,0 fL ($\pm 2,7$) no momento 7. O grupo II, iniciou com o valor médio abaixo do parâmetro de referência, com 34,7 fL ($\pm 4,8$) no momento 0, reduzindo para 29,8 fL ($\pm 7,0$) no momento 7. Os resultados mostraram que houve diferença estatística significativa entre os grupos I e II para VCM em todos os momentos (de 0 a 7) avaliados. Dentro do grupo I só houve diferença estatística entre os momentos 3 e 4 e ambos não diferiram dos demais. Dentro do grupo II não houve diferença entre os momentos.

Os resultados obtidos no grupo I se assemelham ao encontrados por Valeri et al. (1982) e Souza (2009), justificando que o aumento do VCM no 21º dia e 35º dia, pode ser explicado pelas variações no volume de hemácias durante a conservação. Esta alteração deve-se a falência da bomba de Na^+/K^+ , acúmulo de substâncias osmóticas e a perda progressiva da área de superfície da hemácia.

Segundo Ribeiro Filho et al. (1992), pelo desequilíbrio osmótico intra-eritrocitário, pela hemólise, aumento da acidez, falha na bomba Na^+/K^+ e diminuição do colesterol na membrana eritrocitária, o plasma torna-se hipertônico. Consequentemente, havendo diminuição gradual do VCM, as hemácias desidrataram e tornaram-se menores. O que possivelmente pode ter ocorrido com o grupo II.

As médias da Proteína Plasmática Total (PPT) (g/dL), nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) podem ser observados nas tabelas 3 e 4.

Os níveis plasmáticos médios de PPT reduziram nos grupos 1 e 2. No grupo I, foi de 6,61 g/dL ($\pm 0,67$) no primeiro dia do armazenamento, para 5,32 g/dL ($\pm 0,58$) no último dia de armazenamento. No momento 0 o valor médio encontrado no grupo II, foi de 8,7 ($\pm 1,67$) e no momento 7 reduziu para 5,82 ($\pm 1,62$). Os grupos I e II sofreram uma diminuição dos valores e no momento 3 até o momento 6 permaneceram com médias muito semelhantes estatisticamente.

Em ambos os grupos observou-se que ocorreu uma diminuição na concentração de proteínas plasmáticas, mantendo-se estável a partir do momento três.

Ribeiro Filho et al. (1992), Costa Júnior (2006) e Souza (2009) também observaram uma diminuição na concentração de proteínas plasmáticas durante o período de armazenamento.

Para Cairutas (1985) pode ocorrer uma desnaturação protéica durante o período de estocagem, provavelmente ocasionado pela diminuição do pH sanguíneo.

As análises de variação da concentração média do Fibrinogênio plasmático (g/dL), nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) estão descritos nas tabelas 3 e 4.

Os valores de Fibrinogênio do grupo I tiveram média de 275 mg/dL ($\pm 128,17$) que ao final do período de armazenamento aumentou para 300 mg/dL ($\pm 103,51$), não apresentando diferença estatística entre os diferentes momentos analisados. No grupo II ocorreu um aumento significativo de 300 ($\pm 166,90$) para 525 ($\pm 198,21$). Em geral houve diferença estatística entre os grupos 1 e 2 (Figura 6), em ambos os grupos houve alterações, mas estão dentro dos valores de referência, segundo Thrall (2007).

Valores médios da Contagem Total de Leucócitos (Leucócitos) (μ L), nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*), (Tabelas 3 e 4).

Houve diminuição dos valores médios de Leucócitos para ambos grupos experimentais. No primeiro momento, o grupo I se apresentou com o valor de 18.275 μ L ($\pm 2.597,77$) e finalizou os 21 dias com 9.200 μ L ($\pm 4.232,44$). O grupo II, no momento 0 com 14.137,5 μ L ($\pm 1.953,71$) reduzindo para 11.700 μ L (desvio padrão $\pm 956,09$) não houve diferença estatística entre os diferente momentos. Os grupos sofreram uma redução nos seus valores médios durante os 21 dias, porém estiveram com seus valores em semelhança estatística significativa nos momentos 2 ao 6 (Tabelas 3 e 4).

Estes resultados corroboram com Ribeiro Filho et al. (1992) e Souza (2009), que verificaram que a diminuição da Contagem Total de Leucócitos pode estar ligada a degranulação dos polimorfonucleares, que são destruídos mais rapidamente que os linfócitos.

As médias da Concentração de Sódio Plasmático (Na^+), nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) podem ser visualizadas nas tabelas 5 e 6.

Houve redução dos valores médios da concentração de Na^+ em ambos os grupos analisados. O grupo I apresentou no momento 0 a média de 201,5 mmol/L ($\pm 6,14$) e no momento 7 a média foi de 176,13 mmol/L ($\pm 2,07$). No grupo II houve uma redução de 183,88 mmol/L ($\pm 28,03$) para 159,88 mmol/L ($\pm 8,24$). Não houve diferença estatística durante os momentos análise de ambos os grupos, mas ocorreu diferença estatística entre os grupos nos momentos 5 e 6.

Segundo Ribeiro Filho et al. (1992), a diminuição dos valores da concentração de Na^+ Plasmático ocorre devido à diminuição de adenosina trifosfato (ATP) no plasma. Assim, ocasionando acúmulo de sódio no meio intracelular e redução da sua concentração no meio extracelular.

As médias dos valores da Concentração de Potássio Plasmático (K^+), nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*) estão descritos nas tabelas 5 e 6.

Os grupos apresentaram um aumento durante o período de armazenamento. Grupo I no momento 0 demonstrou o valor de 4,14 mmol/L ($\pm 0,78$) e no momento 7 foi de 5,78 mmol/L ($\pm 0,82$). O grupo II iniciou com médio de 5,18 mmol/L ($\pm 0,51$), não houve diferença entre os oito momentos. Ambos os grupos obtiveram valores médios estatisticamente semelhantes nos momentos 3 ao 5.

As prováveis causas para aumento de potássio são hemólise, com liberação do K^+ para o plasma (MICHAEL, 1975; GANESH & KAMALAPUR, 1983, CAIRUTAS, 1985; RIBEIRO FILHO et al., 1992), diminuição do colesterol da membrana eritrocitária (GREENWALT, 1984) e falha na bomba de Na^+/K^+ (MICHAEL, 1975; LATHAM, 1982; FAGIOLO, 1986; HOGMAN, 1999).

O aumento de K^+ extracelular indica diminuição da capacidade da membrana em manter a concentração de potássio no meio intracelular, ou indica hemólise (COSTA JÚNIOR, 2006).

Os valores médios da Concentração de Lactato Plasmático, nos oito momentos de análise do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, do grupo I (hígido) e do grupo II (*Anaplasma marginale*), (Tabelas 5 e 6).

Houve um aumento da Concentração de Lactato Plasmático significativo estatisticamente nos dois grupos. O grupo I apresentou valor médio no momento 0 de 4,09 mg/dL ($\pm 5,34$) aumentando para 16,47 mg/dL ($\pm 5,77$) após 21 dias de conservação. No grupo II, o valor médio foi de 9,26 mg/dL ($\pm 5,23$) este

valor médio elevou-se para 15,96 mg/dL ($\pm 6,06$) no momento sete. Nos dois primeiros momentos os grupos se diferenciaram e posteriormente não houve diferença estatística significativa.

Estes resultados corroboram com os encontrados por Costa Júnior (2006), que descreve o aumento devido ao metabolismo da glicose dentro da bolsa de transfusão com CPDA-1.

CONCLUSÕES

O armazenamento do sangue bovino normal e parasitado com *Anaplasma marginale* em bolsas plásticas contendo CDPA-1, a 4°C por 21 dias provocou, a redução dos valores médios, para ambos os grupos, na Contagem Total de Hemácias, Concentração de Hemoglobina, Volume Globular, Proteína Plasmática Total, Contagem Total de Leucócitos e do Sódio Plasmático. Aumento, em ambos os grupos, no Volume Corpuscular Médio, Teor de Lactato e Potássio Plasmáticos. Entretanto, não inviabilizou que este sangue fosse transfundido nos bezerros receptores.

Após 21 dias de conservação os sangues, normal e parasitado com *Anaplasma marginale*, foram transfundidos para bezerros receptores e não foram observadas reações transfusionais adversas, no entanto o bezerro esplenectomizado que recebeu sangue parasitado apresentou parasitemia com *Anaplasma marginale*.

REFERÊNCIAS

Almosny, N. R. P.; Soares, F. M. D.; Cardoso, A.; Vasconcelos, T. C. e Monteiro, A. O. 2000. Avaliação da deficiência eritrocitária da glicose-6-fosfato desidrogenase e valores hematológicos de equinos de salto. Rev. Bras. de Ciências Vet. 7(1):14-16.

Bazan, C.T. Camargo, G.O.A. e Santos, M.A. 2008. Babesiose bovina. Revista eletrônica de Medicina Veterinária. n. 11.

Cairutas, C.M. 1985. Componentes e derivados do sangue para uso terapêutico. Recife: Editora Universitária, 379p.

Chiaromont, D. 2004. Blood-Component therapy: selection, administration and monitoring. Clin. Tech. Small Anim Pract. 19(2):63- 67.

Costa Júnior, J.D. 2006. Avaliação do sangue total de cães armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 37p.

Fagiolo, E., Mores, N., Pelliccetti, A. 1986. Biochemical parameters to asses viability of blood stored for transfusion use. Fol Haematol., Leipzig, 113:783-789.

Feldman, B. F.; Zinkl, J. G. e Jain, N. C. 2000. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 1344p.

Fischer, T.H.; Robbins, M.E.; Bode, A.P.; Nichols, T.C.; Bellinger, D.E. e Schoenfisch, M. H. 2004. Evidence that rehydrated, lyophilized red blood cells are sufficiently deformable for normal microcirculation transit. Microsc Res Tech. 65(1-2): 62-71.

Freitas, E.; Melo, M.N. Costa-Val A.P.; Michalick, M.S.M. 2006. Transmisión of *Leishmania infantum* via blood transfusión in dogs: potencial for infection and importante of clinical factors, Vet Parasit. 137:159–167.

Ganesh, T. & Kamalapur, P.N. 1983. Biological alterations in bovine blood stored in acid citrate dextrose (ACD) at 4°C. *Ind Vet J, Madras*. 60:439-444.

Greenwalt, T.J., Bryan, D.J., Dumaswala, U.J. 1984. Erythrocyte membrane vesiculation and changes in membrane composition during storage in citrate-phosphate-dextrose-adenine-1. *Vox Sanguinis*, Basel. 47:261-270.

Hogmann, C. F.; Knutson, F. e Loof, H. 1999. Storage of whole blood before separation: the effect of temperature on red cell 2,3 DPG and the accumulation of lactate. *Transfusion*. 39: 492-497.

Hogmann, C. F Knutson, F. e Loof, H. e Payrat, J. M. 2002. Improved maintenance of 2,3 DPG and ATP in RBCs stored in a modified additive solution. *Transfusion*. 24:824-829.

Kerr, M.G. 2003. *Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária*. 2th ed. Roca. 436p.

Kessler, R. H. e Schenk, M. A. M. 1998. *Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos bovinos*. EMBRAPA – CNPGC. 157p.

Latham, J.T., Bove, J.R., Weirich, F.L. 1982. Chemical and hematologic changes in stored CPDA-1 blood. *Transfusion, Philadelphia*. 22:158-159.

LANEVSKI, A. & WARDROP, K. J. 2001. Principles of transfusion medicine in small animals. *Can Vet J*. 42: 447-454.

Lopes, R.S.; Kohayagawa, A.; Ribeiro Filho, J.D. 1995. Alterações hematológicas e bioquímicas em sangue total de equinos, conservado para transfusão em bolsas plásticas com ADC-F. *Rev Univ Rural: Ciência da Vida*. 17: 91-94.

Michael, J.M. Dorner, I. Burns, D. Kohayagawa, A. Schank, M.A.M. 1975. Potassium load in CPD-preservad whole blood and two types of packed red blood cells. *Transfusion*. 15(2):144-149.

Ribeiro Filho, J.D.; Almeida, C.T.; Gonçalves, R.C.; Kohayagawa, A.; Curi, P.R. 1992. Alterações hemogasométricas de sangue bovino durante a conservação em frascos de vidro com ACD e bolsas plásticas com CPDA-1, por 35 dias. *Dissertação de Mestrado em Fisiopatologia em Clínica Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP*. 122p.

Reichmann, P. & Dearo, A. C. O. 2001. Transfusão de sangue e seus derivados em grandes animais. *Seminário: Ciências Agrárias, Londrina*. 22(2): 223-228.

Silva, S. S.; Cunha, C. W. ; Osório, B. L. ; Dutra, C. L. 1998. Alterações hematológicas e sorológicas em equinos experimentalmente infectados com *Babesia equi*. *Ciência Rural, Santa Maria – RS*. 28(2):283-286.

Souza, R.S.; Barreto, J.R.; Sousa, I.K.F. Chaves, D.F.; Soares, H.F. Barros, I.O.; Minervino, A.H.H. e ORTOLANI, E.L. 2009. Avaliação do sangue total de ovino armazenado em bolsas de sangue (CPDA-1) mantido sob refrigeração. *Ciência Animal Brasileira-Suplemento 1- Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria*.p.290-295 (Resumo).

Taylor, M.A.; Coop, R.L.; Wall, R.L. 2009. *Parasitologia Veterinária*. 3th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 726p.

Thrall, M.A. 2007. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1th ed. Roca. 592p.

Ou, D.; Mahaffey, E.; Smith, J.E. 1975. Effect of storage on oxygen dissociation of canine blood. J Am Anim Hosp Assoc. 167:56- 58.

Weiss, D.J. & Wardrop, K.J. 2010. Schalm's Veterinary Hematology. 6th ed. Wiley-Blackwell. Ioma, USA. 1206p.

Valeri, C.R., Valeri, D.A., Gray, A. 1982. Viability and function of red blood cell concentrates stored at 4°C for 35 days in CPDA-1, CPDA-2 or CPDA-3. Transfusion, Philadelphia. 22:210-216.

Vidotto O. & Marana, E.R.M. 2001. Diagnóstico em anaplasmosse bovina. Ciência Rural. 31(2):361-368.

Os Quadros

TABELA 1. Valores de referência bovinos normais para Hemograma segundo o Laboratório Clínico Veterinário “Profa. Dra. Aguemi Kohayagawa”

	He (x106/ μ L)	Hb (g/dL)	VG (%)	VCM (fL)	Leucócitos (x103/ μ L)	PPT g/dL	Fibrinogênio (%)
Bovino	5,0 a 10,0	8 a 15	24 a 46	40 a 60	4,0 a 12,0	7 a 8,5	300 a 700

TABELA 2. Valores de referência bovinos normais para Bioquímica segundo o Laboratório Clínico Veterinário “Profa. Dra. Aguemi Kohayagawa”

	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)	Lactato (mg/dL)
Bovino	132 a 152	3,9 a 5,8	5 a 20

TABELA 3. Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores da Contagem Total de Hemácias ($\times 10^6/\mu$ L), Concentração de Hemoglobina (g/dL), Volume Globular (%), Volume Corpuscular Médio (fL), Proteína Plasmática Total (g/dL), Fibrinogênio plasmático (mg/dL) e Contagem Total de Leucócitos (μ L) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido). Botucatu -SP, 2011

Momento	He*	Hb**	VG**	VCM**	PPT**	Fibrinogênio**	Leucócitos**
0	6,55 $\pm$ 1,03	9,95 $\pm$ 0,56 aA	29,62 $\pm$ 1,36 aA	45,68 $\pm$ 2,57 aAB	6,61 $\pm$ 0,67 bA	275 $\pm$ 128,17 aA	18.275,0 $\pm$ 2.597,77 aA
1	6,32 $\pm$ 1,12	10,1 $\pm$ 0,98 Aa	30,12 $\pm$ 3,59 aA	48,98 $\pm$ 8,13 aAB	6,48 $\pm$ 0,67 bA	450 $\pm$ 0,00 aA	16.775,0 $\pm$ 3.915,81 aAB
2	5,92 $\pm$ 0,83	9,70 $\pm$ 1,15 aA	28,12 $\pm$ 2,83 aAB	48,56 $\pm$ 7,96 aAB	6,58 $\pm$ 0,51 bA	375 $\pm$ 70,71 aA	14.325,0 $\pm$ 3.304,87 aBC
3	5,90 $\pm$ 1,11	9,96 $\pm$ 0,93 aA	24,62 $\pm$ 2,56 aBC	43,06 $\pm$ 8,60 aA	5,32 $\pm$ 0,67 aC	375 $\pm$ 0,00 bA	13.737,5 $\pm$ 972,11 aBC
4	4,74 $\pm$ 1,36	9,68 $\pm$ 0,83 aA	24,62 $\pm$ 3,02 aBC	56,65 $\pm$ 18,36 aB	5,70 $\pm$ 0,67 aB	350 $\pm$ 103,51 bA	12.825,0 $\pm$ 5.073,87 aCD
5	4,88 $\pm$ 0,54	8,69 $\pm$ 1,41 aA	24,88 $\pm$ 5,14 aBC	51,99 $\pm$ 5,26 aAB	5,30 $\pm$ 0,43 aC	350 $\pm$ 70,71 aA	10.900,0 $\pm$ 5.474,21 aCDE
6	4,96 $\pm$ 0,44	8,60 $\pm$ 1,21 aA	24,00 $\pm$ 3,16 aC	49,02 $\pm$ 3,55 aAB	5,65 $\pm$ 0,72 aB	300 $\pm$ 141,42 bA	10.025,0 $\pm$ 3.341,09 aDE
7	4,60 $\pm$ 1,01	8,61 $\pm$ 0,41 aA	23,62 $\pm$ 2,13 aC	54,08 $\pm$ 13,17 aAB	5,32 $\pm$ 0,58 bC	300 $\pm$ 103,51 bA	9.200,0 $\pm$ 4.232,44 bDE

*Médias para Contagem Total de Hemácias não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05)

**Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05)

TABELA 4. Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores da Contagem Total de Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), Concentração de Hemoglobina (g/dL), Volume Globular (%), Volume Corpuscular Médio (fL), Proteína Plasmática Total (g/dL), Fibrinogênio plasmático (mg/dL) e Contagem Total de Leucócitos (μL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu -SP, 2011

Momento	He*	Hb**	VG**	VCM**	PPT**	Fibrinogênio**	Leucócitos**
0	5,49 $\pm$ 0,62	7,76 $\pm$ 2,36 bA	19,25 $\pm$ 1,25 bA	34,75 $\pm$ 4,92 bA	8,70 $\pm$ 1,67 aA	300 $\pm$ 166,90 aC	14.137,5 $\pm$ 1.953,71 bA
1	5,38 $\pm$ 0,66	7,60 $\pm$ 1,39 bA	18,38 $\pm$ 2,39 bAB	34,06 $\pm$ 4,86 bA	8,62 $\pm$ 1,58 aA	300 $\pm$ 239,05 bC	13.850,0 $\pm$ 1.007,74 bA
2	4,42 $\pm$ 0,69	5,49 $\pm$ 2,16 bB	15,50 $\pm$ 5,75 bB	35,28 $\pm$ 1,08 bA	8,58 aA $\pm$ 1,61	375 $\pm$ 225,20 aBC	13.625,0 $\pm$ 804,34 aA
3	4,24 $\pm$ 0,64	4,12 $\pm$ 2,12 bBC	11,25 $\pm$ 5,01 bC	27,16 $\pm$ 4,85 bA	5,30 $\pm$ 1,57 aD	525 $\pm$ 128,17 aAB	13.162,5 $\pm$ 1.842,36 aA
4	3,82 $\pm$ 0,50	4,56 $\pm$ 2,03 bBC	9,50 $\pm$ 3,56 bC	25,58 $\pm$ 4,94 bA	5,65 $\pm$ 1,62 aBC	625 $\pm$ 256,35 aA	12.425,0 $\pm$ 1.079,68 aA
5	3,44 $\pm$ 0,62	3,62 $\pm$ 1,51 bC	11,38 $\pm$ 3,62 bC	34,25 $\pm$ 6,21 bA	5,45 $\pm$ 1,57 aCD	200 $\pm$ 151,19 bC	12.362,5 $\pm$ 769,44 aA
6	3,94 $\pm$ 0,82	3,70 $\pm$ 1,90 bC	10,75 $\pm$ 4,99 bC	28,50 $\pm$ 6,02 bA	5,58 $\pm$ 1,59 aBCD	525 $\pm$ 198,21 aAB	11.687,5 $\pm$ 601,04 aA
7	3,61 $\pm$ 0,63	3,24 $\pm$ 2,58 bC	10,38 $\pm$ 6,69 bC	29,84 $\pm$ 6,82 bA	5,82 $\pm$ 1,62 aB	525 $\pm$ 198,21 aAB	11.700,0 $\pm$ 956,09 aA

*Médias para Contagem Total de Hemácias não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P>0,05$)

**Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P>0,05$)

TABELA 5. Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores da Concentração de Sódio, Potássio (mmol/L) e Lactato Plasmáticos (mg/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo I (hígido). Botucatu - SP, 2011

Momento	Na+	K+	Lactato
0	201,5 $\pm$ 6,14 aA	4,14 $\pm$ 0,78 bCD	4,09 $\pm$ 5,34 bB
1	200,88 $\pm$ 16,48 aA	4,02 $\pm$ 0,52 bD	3,95 $\pm$ 4,66 bB
2	193,38 $\pm$ 20,26 aA	4,26 $\pm$ 0,65 bCD	6,48 $\pm$ 6,18 aB
3	188,88 $\pm$ 9,88 aA	4,54 $\pm$ 0,40 aCD	13,40 $\pm$ 5,34 aA
4	186,50 $\pm$ 4,58 aA	4,79 $\pm$ 0,48 aBC	15,29 $\pm$ 6,30 aA
5	184,88 $\pm$ 8,08 aA	5,31 $\pm$ 1,20 aAB	14,13 $\pm$ 6,04 aA
6	181,00 $\pm$ 9,91 aA	5,62 $\pm$ 0,81 aA	14,54 $\pm$ 6,96 aA
7	176,13 $\pm$ 2,07 aA	5,78 $\pm$ 0,82 aA	16,47 $\pm$ 5,77 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($P>0,05$)

TABELA 6. Médias $\pm$ Desvios-padrão dos valores da Concentração de Sódio, Potássio (mmol/L) e Lactato Plasmáticos (mg/dL) de bezerros mestiços Nelore/Caracu, entre oito a 12 meses de vida, nos oito momentos de análise, do sangue conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1, com intervalo de três dias entre cada análise. Grupo II (*Anaplasma marginale*). Botucatu - SP, 2011

Momento	Na⁺	K⁺	Lactato
0	183,88 $\pm$ 28,03 aA	5,18 $\pm$ 0,53 aA	9,26 $\pm$ 5,23 aBC
1	183,25 $\pm$ 15,73 aA	5,04 $\pm$ 0,51 aA	9,08 $\pm$ 4,16 aBC
2	181,63 $\pm$ 8,37 aA	4,78 $\pm$ 0,24 aA	8,28 $\pm$ 2,75 aC
3	174,75 $\pm$ 9,10 aA	4,88 $\pm$ 0,41 aA	13,45 $\pm$ 3,67 aAB
4	169,25 $\pm$ 15,21 aA	5,08 $\pm$ 0,34 aA	17,18 $\pm$ 4,01 aA
5	164,75 $\pm$ 16,80 bA	5,09 $\pm$ 0,25 aA	14,62 $\pm$ 3,87 aA
6	160,12 $\pm$ 27,55 bA	5,10 $\pm$ 0,68 bA	15,02 $\pm$ 6,03 aA
7	159,88 $\pm$ 8,24 aA	5,21 $\pm$ 0,51 bA	15,96 $\pm$ 6,06 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (P>0,05)