

# Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia, pela reação de imunofluorescência indireta e ELISA

## Studies on the prevalence of antibodies against *Anaplasma marginale* in dairy cattle in the microregion of Goiânia, by the indirect fluorescent antibody test and ELISA

Hélvio Queiróz dos Santos,\* Cláudio Roberto Madruga,\*\* Guido Fontgalland Coelho Linhares\*\*\*

### Resumo

A pesquisa teve como objetivo o cálculo da prevalência de *Anaplasma marginale* no rebanho bovino de leite da microrregião de Goiânia, por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e reação imunoenzimática indireta (ELISA). No delineamento experimental o mapa da microrregião foi dividido em 47 quadrantes, dos quais 25 foram sorteados para a colheita de material. Em cada propriedade visitada foi colhido sangue aleatoriamente em cerca de 10% dos animais. Dessa forma, foram colhidas 521 amostras de sangue, número acima do recomendado pelo modelo estatístico adotado.

Do total das amostras testadas, 505 foram positivas à RIFI e 517 ao ELISA, correspondendo a prevalência de 96,92% e 99,23%, respectivamente. A análise estatística dos resultados obtidos por ambas as técnicas sorológicas revelou uma concordância de 96,16% entre elas, e nenhuma diferença estatisticamente significativa. Das 25 propriedades rurais visitadas, todas (100%) apresentaram rebanhos positivos para os testes sorológicos. Com base nos dados obtidos, a microrregião de Goiânia pôde ser caracterizada como área de estabilidade enzoótica para *A. marginale*, sendo elevado, os riscos de perdas econômicas na introdução de animais suscetíveis provenientes de áreas livres da enfermidade, sem um planejamento profilático adequado.

**Palavras-chave:** *Anaplasma marginale*; anaplasrose; bovinos; epidemiologia; reação de imunofluorescência indireta; ELISA.

### Abstract

This research was performed to determine *Anaplasma marginale* prevalence in dairy cattle in the microregion of Goiânia by the indirect fluorescent antibody test (IFAT) and enzyme linked immunoassay (ELISA). In the experimental design of this study, the map of the microregion was divided into 47 squares, from which 25 were randomly chosen to be visited for blood sampling. Blood was drawn randomly from 10% of the animals in each property. Five hundred and five and 517 out 521 were positive respectively in the IFAT and ELISA, corresponding 92,9% of prevalence for the former serological test and 99,2% for the latter. The results did not show any significant statistical difference between both serological test and the agreement was 96,16%. No significant statistical difference was detected between ages. Cattle from all 27 properties were positive for both serological methods. The results of this study characterized the region as a stable area for *A. marginale*, therefore there is a potential risk of economic losses in the trade of cattle coming in from non enzootic areas.

**Keywords:** *Anaplasma marginale*; anaplasmosis; cattle; epidemiology; indirect fluorescent antibody test; ELISA.

### Introdução

A anaplasrose é causada pela riquetsia *Anaplasma marginale* da ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae (Weiss e Moulder, 1984) que ocorre em ruminantes e tem localização intraeritrocítica obrigatória (Ristic, 1981).

A principal forma de transmissão do *A. marginale* ocorre através de vetores, sendo que várias espécies de carrapatos e insetos hematófagos têm sido apontadas como transmissoras em potencial, podendo ainda ser transmitido por via iatrogênica ou intra-uterina (Ribeiro et al., 1985; Guglielme, 1995).

\*Médico Veterinário-Pós-Graduando de Mestrado em Medicina Veterinária/Sanidade Animal da Escola de Veterinária da UFG-Bolsista do CNPq. E-mail: helter@zaz.com.br.

\*\*Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte. CNPQG/EMBRAPA. Campo Grandes, MS. E-mail: madruga@cnpqc.embrapa.br.

\*\*\*Departamento de Medicina Veterinária/Escola de Veterinária/UFG. E-mail: guidofcl@vet.ufg.br.

A doença apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo nas Américas, na África e na Austrália (Kessler e Schenk, 1998) e, de acordo com Su e Hsu (1993), a enfermidade também é registrada em partes da Europa, na Oceania e no sudoeste da Ásia.

A anaplasmosose causa sérios prejuízos econômicos para a bovinocultura em função de danos diretos e indiretos, observados devido à mortalidade, diminuição na produção de carne e leite, custos com medicamentos, premunicação ou vacinação (Tapia et al. 1996). Montenegro-James et al. (1991) estimaram prejuízos de aproximadamente 513 milhões de dólares anuais para a América Latina em decorrência desta enfermidade.

No Brasil as estimativas de perdas econômicas devido à tristeza parasitária bovina são escassas. Montenegro-James et al. (1991) fizeram referência a perdas de 90 milhões de dólares anuais para o Rio Grande do Sul. O ministério da Agricultura e Abastecimento (1998) considera que o *A. marginale* pode ser encontrado em praticamente todo o território nacional, já que seus vetores ocorrem em todo o país, sendo que em 1994 foram registrados 3.906 focos da doença e 8.572 casos.

Estudos sorológicos têm sido realizados em alguns estados da federação. Pelo teste do cartão, Ribeiro e Reis (1981) encontraram soroprevalências para *A. marginale* entre 88% e 92%, em rebanhos de quatro regiões distintas do estado de Minas Gerais. Ribeiro et al. (1984), em levantamento sorológico em bovinos da Zona da Mata Mineira, encontraram 81,1% dos soros positivos à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e 73,5% ao teste do cartão na detecção de anticorpos contra o *A. marginale*. Oliveira et al. (1992) verificaram 16,3% de prevalência para bezerros em fazendas leiteiras de Sergipe, pelo teste do cartão. Estudando a epidemiologia da anaplasmosose no Rio Grande do Sul, Artiles et al. (1995) detectaram prevalência de 64%. Vidotto et al. (1997) relataram resultado de 67,4% em Londrina, pela RIFI. No ano seguinte, Vidotto et al. (1998), utilizando o teste de ELISA competitivo, reportaram uma prevalência de 87,56% naquela mesma região. No estado da Bahia, Araújo et al. (1998) apontaram 92,7% como prevalência de bovinos sororeagentes para *A. marginale*, na microrregião de Jequié e 95,16% em Vitória da Conquista, pela RIFI.

Na literatura são inexistentes dados sobre o assunto com referência ao estado de Goiás. O principal objetivo deste trabalho foi realizar o estudo da prevalência de anticorpos anti-*A. marginale* em bovinos de leite, de diferentes faixas etárias, na microrregião de Goiânia, visando obter dados para uma efetiva caracterização epidemiológica da anaplasmosose na região.

## Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido na microrregião de Goiânia, que ocupa uma área de 6.847,9 km<sup>2</sup>, situada em região de cerrado do estado de Goiás, com altitude variando de 707 a 1.030 metros e localiza-se entre as latitudes 16° 23' e 16° 58' e as longitudes 48° 57' e 49° 31' (SEPLAN, 1996). O clima da região é tropical com duas estações bem definidas, verão chuvoso, com precipitações máximas de 300mm, e inverno seco, com mínimas inferiores a 11mm (IBGE, 1994). A microrregião possui um rebanho aproximado de 565.710 (SEPLAN, 1996).

O mapa da microrregião de Goiânia foi dividido em 47 quadrantes de 225 km<sup>2</sup> cada. Posteriormente foi realizado um sorteio de 25 quadrantes, correspondendo a mais de 50% do total da área abrangida pelo estudo (Alves, 1987). Para cada quadrante sorteado foi escolhida uma propriedade de acordo com a disponibilidade de acesso ao produtor. Foram colhidas amostras de sangue, ao acaso, em bovinos com idade acima de um ano, em aproximadamente 10% do total de animais de cada propriedade.

O número de amostras para o estudo de prevalência foi calculado de acordo com o Centro Panamericano de Zoonoses (1973), tendo sido encontrado o valor de 180 como o número mínimo de amostras representativo para a população de bovinos dessa microrregião; o trabalho foi realizado utilizando-se 521 amostras. O valor utilizado para a prevalência estimada foi de 98%, obtido a partir de um pré-experimento realizado com as 100 amostras de soros colhidos aleatoriamente em bovinos da região. O grau de confiança adotado foi de 95% e a margem de erro admitida de 5%.

A colheita de sangue foi realizada nos meses de fevereiro e março de 1998, por punção de 10ml de sangue da veia jugular em tubos de ensaio utilizando-se agulhas 40x16 mm. Após a completa coagulação sangüínea, as amostras foram levadas ao laboratório para centrifugação e separação dos soros, sendo estes distribuídos em alíquotas de 3ml e congelados a -70°C para posterior utilização nas provas sorológicas.

Os antígenos de *A. marginale* utilizados no teste de ELISA foram produzidos no Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte (CNPGC), de acordo com Madruga et al. (1996). Para a RIFI os antígenos foram produzidos segundo IICA (1987), a partir de sangue de animais suscetíveis, infectados experimentalmente, durante pique inicial de parasitemia.

Os testes sorológicos foram realizados no laboratório de hemoparasitologia da Embrapa Gado de Corte, conforme técnicas padronizadas por Madruga et al. (1996) para o ELISA e Madruga et al. (1986) para a RIFI.

Resumidamente, o ELISA foi realizado com antígeno bruto obtido a partir de uma parasitemia de 80% e na concentração de 0,328mg por poço da placa de 96 poços para ELISA. Os soros controles e teste foram diluídos 1:1000 e o conjugado anti-Ig bovino marcado com fosfatase alcalina na diluição 1:12000. A leitura dos resultados foi realizada por espectrofotometria, com filtro de 405nm, em um leitor de ELISA.<sup>1</sup>

Para a execução da prova de IFI utilizou-se o conjugado anti-IgG bovina com isotiocianato de fluoresceína.<sup>2</sup> A titulação prévia do conjugado foi determinada em 1:640. As amostras de soro foram testadas nas diluições de 1:320 e 1:640 em solução tampão salina fosfatada pH 7,2 (PBS) e a leitura dos resultados foi realizada em microscópio de epifluorescência,<sup>3</sup> com aumento de 400x.

A avaliação da correlação entre os resultados da RIFI e do ELISA foi feita utilizando-se o método do Qui-quadrado segundo Siegel (1979). A concordância entre os dois testes foi defi-

<sup>1</sup> UV-VIS METROLAB mod-M980 NS - 95129801 Hz - 50/60 W - 50.

<sup>2</sup> FITC - Anti-IgG bovina conjugada com isotiocianato de fluoresceína - Sigma.

<sup>3</sup> CARL ZEISS - AXIOSKOP HBO 50.

nida conforme Mathias e MacMillan (1995). A correlação entre os resultados da prevalência para as diferentes faixas etárias foi determinada através do teste do Qui-quadrado com correção de Yates. As frequências relativas e as absolutas referentes às variáveis estudadas foram calculadas e descritas para os testes aplicados (Siegel 1979).

## Resultados e discussão

Entre as 521 amostras de soros testadas, 505 apresentaram resultados positivos ao teste de RIFI, correspondendo a uma prevalência de anticorpos fluorescentes de 96,93% na população estudada. A prova de ELISA detectou 517 soros positivos, portanto, prevalência de 99,23% (Tabela 1). Através do tratamento estatístico adotado, as provas de RIFI e ELISA apresentaram diferenças estatisticamente não-significativas e mostraram concordância de 96,16%. Das 25 propriedades rurais visitadas, todas (100%) apresentavam rebanho positivo para *A. marginale* por ambos os testes. Das 521 amostras estudadas, 20 (3,83%) foram negativas à RIFI ou ELISA, sendo que 16 amostras reagiram negativamente à RIFI e somente quatro ao ELISA. Nenhuma amostra foi negativa simultaneamente às duas provas.

**Tabela 1:** Frequência relativa e absoluta de bovinos positivos à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ao ELISA, com relação à idade, na microrregião de Goiânia

Idade (anos)	Nº Amostras	RIFI		ELISA	
		Absoluta	Relativa (%)	Absoluta	Relativa (%)
2 a 3	31	27	87,10	31	100,00
3 a 4	96	93	96,87	96	100,00
acima de 4	394	385	97,71	390	98,98
Total	521	505	96,93	517	99,23

Os resultados referentes à prevalência são próximos daqueles verificados por Ribeiro e Reis (1981) e Ribeiro et al. (1984) para diferentes regiões de Minas Gerais, assim como daqueles obtidos por Araújo et al. (1998) na Bahia e por Vidotto et al.

## Referências bibliográficas

- ALFARO, C., TORO BENITEZ, M., GARCIA, F., VALLE, A. Epidemiology of bovine anaplasmosis in the State of Monagas, Venezuela. Relationship with extrinsic characteristics of the host. *Vet. Trop.*, v. 23, n. 1, p. 65-79, 1998.
- ALVES, L. C. Prevalência da babesiose bovina em gado leiteiro no município de Garanhuns, Estado de Pernambuco. 1987. 123 p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo.
- ARAÚJO, F. R., LEAL, C. R. B., BASTOS, P. A. S., MADRUGA, C. R., MARQUES, A. P. C. Comparação dos testes de imunoadsorção enzimática, congutinação rápida e imunofluorescência indireta na detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 6, n. 2, supl. 1, 1997.

(1998) em Londrina. Resultados ligeiramente inferiores foram relatados por Vidotto et al. (1997) para a região de Londrina, ao passo que Oliveira et al. (1992) detectaram resultados significativamente inferiores no estado de Sergipe.

Os resultados distintos relativos às taxas de prevalência verificadas entre diferentes regiões, de acordo com Guglielmone (1995) e Kessler e Shenk (1998), podem ser decorrentes das condições climáticas próprias de cada região, que atuam como importante fator de pressão sobre os diferentes níveis de populações de carrapatos e dípteros hematófagos e, dessa forma, determinando características epidemiológicas locais, ou ainda, pela falta de padronização dos testes.

A concordância entre os métodos de RIFI e ELISA, observada neste trabalho, está de acordo com resultados reportados por Nielsen et al. (1996), Araújo et al. (1997), Braz Jr. et al. (1997).

O tratamento estatístico aplicado demonstrou haver diferença estatisticamente não significativa entre os resultados para os diferentes grupos etários. Resultados semelhantes foram relatados por Payne et al. (1988), Tapia et al. (1996) e Alfaro et al. (1998).

Os resultados deste estudo epidemiológico demonstraram uma elevada prevalência de anticorpos anti-*A. marginale* na população de bovinos da microrregião de Goiânia, que, de acordo com conceitos de Mahoney e Ross (1972), adotados por outros autores em estudos epidemiológicos da Tristeza Parasitária Bovina (Wilson e Ronochardjo, 1984; Sanchez et al., 1985; Ortiz, 1985), permitem a caracterização da microrregião como uma área de estabilidade enzoótica para a anaplasmosse bovina. As condições climáticas da região, favoráveis à existência dos vetores durante todo o ano, colaboram para esta situação. Portanto, são mínimos os riscos de ocorrência de surtos de anaplasmosse com perdas econômicas significativas em bovinos adultos da microrregião de Goiânia. No entanto, a introdução de bovinos nessa região, oriundos de áreas livres ou de áreas de instabilidade enzoótica, constitui-se uma atividade de alto risco, devendo ser precedida de medidas profiláticas específicas.

- ARAÚJO, F. R., MADRUGA, C. R., LEAL, C. R. B., BASTOS, P. A. S., MARQUES, A. P. C. Frequência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 50, n. 3, p. 243-246, 1998.
- ARTILES, J., ALVES-BRANCO, P. J. F., MARTINS, J. R., CORREA, L. B., SAPPER, M. F. M. Prevalência de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* no município de Bagé, Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 4, n. 2, supl. 1, 1995.
- BRAZ Jr., C. J., PASSOS, L. M. F., LIMA, J. D., RIBEIRO, M. F. B. Comparação entre o ELISA e a reação de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 49, n. 5, p. 543-549, 1997.
- CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSES. Procedimientos para estudios de prevalencia de enfermedades crónicas en el ganado. Buenos Aires, 1973. 31 p. (Nota Técnica nº 18)

- GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.*, v. 57, p. 109-119, 1995.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Zoneamento ecológico e econômico da área do aglomerado de Goiânia*. Goiânia, 1994.
- IICA - Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. *Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina*. San José, Costa Rica, 1987. (Primer informe).
- KESSLER, R. H., SCHENK, M. A. M. *Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos*. Campo Grande: EMBRAPA - CNPGC, 1998. 157 p.
- MADRUGA, C. R., KESSLER, R. H., SACCO, A. M. S. JESUS, E. F., MIGUITA, C. T. *Produção de antígeno e análise preliminar do teste de imunofluorescência indireta para diagnóstico de anticorpos contra Anaplasma marginale*. Campo Grande: EMBRAPA - CNPGC. ISSN 0100-7858 (Pesquisa em andamento, nº 31), 1986, 4 p.
- MADRUGA, C. R., MARQUES, A. P. C., MIGUITA, M., SCHENK, M. A. M., KESSLER, R. H. A preliminary evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against *Anaplasma marginale*. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: PANVET, 1996. p. 297.
- MAHONEY, D. F., ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.*, v. 48, p. 292-298, 1972.
- MATHIAS, L. A., MacMILLAN, A. P. Comparação de conjugados no teste imunoenzimático competitivo para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. *Pes. Vet. Bras.*, v. 15, n. 4, p. 101-105, 1995.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. *Boletim de Defesa Sanitária Animal*, v. 27, n. 1-4, 1998.
- MONTENEGRO-JAMES, S., GUILLEN, A. T., TORO, M. DOT ELISA para el diagnóstico serológico de anaplasmosis y babesiosis bovinas. *Rev. Cubana Cien. Vet.*, v. 23, n. 1, p. 15-24, 1991.
- NIELSEN, K., SMITH, P., GALL, D., ESHAIDE, S. T., WAGNER, D., DAJER, A. Development and validation of indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera. *Vet. Parasitol.*, v. 67, p. 133-142, 1996.
- OLIVEIRA, A. A., PEDREIRA, P. A. S., ALMEIDA, M. F. R. S. Doenças de bezerros II. Epidemiologia da anaplasmosis no Estado de Sergipe. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 44, n. 5, p. 377-386, 1992.
- ORTIZ, O. B. Consideraciones sobre la epizootiología de anaplasmosis y babesiosis en los bovinos. *Rev. ICA*, v. 20, 1985.
- PAYNE, R. C., WARD, D. E., MURTHALA USMAN, AGUS RUSLI, DEDDY DJAUHARI, AMIR HUSEIN. Prevalence of bovine haemoparasites in Aceh Province of northern Sumatra: implications for imported cattle. *Prev. Vet. Med.*, v. 6, p. 275-283, 1988.
- RIBEIRO, M. F. B., LIMA, J. D., GUIMARÃES, A. M., SCATAMBURIO, M. A., MARTINS, N. E. Transmissão congênita da anaplasmosis bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 47, n. 3, p. 297-304, 1985.
- RIBEIRO, M. F. B., REIS, R. Prevalência da anaplasmosis em quatro regiões do estado de Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 33, n. 1, p. 57-62, 1981.
- RIBEIRO, M. F. B., SANTOS, J. L., SALCEDO, J. H. P., FARIA, J. E. Epidemiologia da anaplasmosis bovina no Estado de Minas Gerais. Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* v. 36, n. 4, p. 425-432, 1984.
- RISTIC, M. Anaplasmosis. In: RISTIC, M., McINTYRE. *Diseases of cattle in the tropics*. The Hague: Martinus Nijhoff Publishers, 1981. p. 327-344.
- SANCHEZ, F. L., RUVALCABA, M. F., TORRES, R. A., ALARCON, G. J. C., SANCHEZ, I. E. Prevalencia de anaplasmosis y babesiosis y determinación de la probabilidad diaria de babesiosis en bovinos del municipio de Villa Comaltitlan, Chiapas. *Tec. Pec. México* v. 48, 1985.
- SEPLAN - Secretaria do Planejamento e Desenvolvimento Regional - Superintendência de Estatística, Pesquisa e Informação. *Anuário Estatístico do Estado de Goiás*. 1996. 621p.
- SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento*. Recife: MacGraw-Hill do Brasil, 1979, 350 p.
- SU, J. F., HSU, F. S. Serological assays and seroprevalence of ruminant *Anaplasma marginale* infection in Taiwan. *J. Cl. Soc. Vet. Sc.*, v. 19, n. 2, p. 79-89, 1993.
- TAPIA, D. G., ROJAS, M. L., BAYÚGAR, R. C., VAZQUEZ, Z. G., ORTÍZ, M. A. G., JALIL, P. D., TORRES, R. A. Seroprevalencia de anaplasmosis en explotaciones bovinas de 18 municipios de la zona Norte de Vera Cruz. *Tec. Pec. México*, v. 34, n. 1, 1996.
- VIDOTTO, O., ANDRADE, G. M., AMARAL, C. S. H., BARBOSA, C. S., FREIRE, R. L., ROCHA, M. A.; VIDOTTO, M. C. Freqüência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da região de Londrina, Paraná. *Arq. Bras. Vet. Zoot.*, v. 49, n. 5, p. 655-659, 1997.
- VIDOTTO, M. C., VIDOTTO, O., ANDRADE, G. M., PALMER, G., McELWAIN, T., KNOWLES, D.P. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in cattle in Parana State, Brazil, by MSP-5 competitive ELISA. *An. New York Acad. Sc.*, v. 849, p. 424-426, 1998.
- WEISS, E., MOULDER, J. W. The rickettsias. In: KRIEG, N. R., HOLT, J. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p. 687-739.
- WILSON, A. J., RONOHARDJO, P. Some factors affecting the control of bovine anaplasmosis with special reference to Australia and Indonesia. *Prev. Vet. Med.*, n. 2, p. 121-134, 1984.