

1 Levantamento sorológico da infecção por *Anaplasma phagocytophilum* em equinos de tração
2 em Belo Horizonte, Minas Gerais.

3 Serosurvey for *Anaplasma phagocytophilum* in equines from Belo Horizonte, Minas Gerais.

4 Resumo

5 A Anaplasmosose Granulocítica Equina (AGE) é causada pelo *Anaplasma phagocytophilum*,
6 bactéria intracelular obrigatória, Gram-negativa, membro da família Anaplasmataceae incluída
7 na ordem das Rickettsiales. Pouco se sabe sobre a doença, dinâmica de transmissão, cepa e
8 prevalência da doença no estado de Minas Gerais. O presente trabalho teve por objetivo realizar
9 um levantamento sorológico utilizando-se do exame da reação de imunofluorescência indireta
10 e a avaliação do esfregaço de capa leucocitária como métodos diagnósticos, a fim de se avaliar
11 a situação da doença em equinos de tração do “Projeto Carroceiros” do município de Belo
12 Horizonte, Minas Gerais. Encontrou-se uma frequência ao exame da reação de
13 imunofluorescência indireta (RIFI) de 53,57% (120/224). Ao exame de capa leucocitária foi
14 encontrado um percentual de 3,14% (7/223) de animais positivos. A maioria das amostras
15 (41,47%) apresentou uma diluição de 1:160, tais amostras foram então submetidas à titulação
16 nas diluições de 1:320, 1:640 e 1:1280. Pode-se concluir que a infecção por *A. phagocytophilum*
17 está presente em cavalos pertencentes ao “Projeto Carroceiros” no município de Belo
18 Horizonte. Para que se entenda melhor qual a importância epidemiológica desta infecção para
19 o município mais levantamentos sorológicos e moleculares, em equinos, devem ser realizados
20 a fim de se entender melhor a dinâmica do agente na população equina.

21 Palavras chaves: Epidemiologia. Imunofluorescência Indireta. Capa Leucocitária. Regionais.

22 Abstract

23 Equine granulocytic anaplasmosis is caused by *Anaplasma phagocytophilum*, an gram negative,
24 obligatory intracellular bacteria, member of Anaplasmataceae family, included in the

1 Rickettsiales order. Little is known about the disease, transmission dynamics, strain and
2 prevalence in Minas Gerais State. This work aimed to do a serosurvey using indirect
3 immunofluorescent assay (IFA) test and evaluation of buffy coat smears as diagnostic methods,
4 to evaluate the disease situation in low weight draft horses of “Projeto Carroceiros” in the
5 municipality of Belo Horizonte, Minas Gerais. It was found a positive reaction in the IFA in a
6 frequency of 53.57% (120/124). In the buffy coat evaluation, it was found a percentage of
7 3.14% (7/223) of positive animals. Most of the samples reacted at a 1:160 dilution and were
8 submitted to titration in the dilutions of 1:320, 1:640 and 1:1280. It is possible to conclude that
9 *A. phagocytophilum* infection is present in horses of “Projeto Carroceiros” of the municipality
10 of Belo Horizonte. In order to better understand the epidemiological importance of this infection
11 to the city it is necessary more studies, serological and molecular, in equines, to comprehend
12 the dynamic of the agent in the equine population.

13 Key-words: Epidemiology. Indirect Immunofluorescence. Buffy coat. Regionals.

14 Introdução

15 A Anaplasmosose Granulocítica Equina (AGE) é causada pelo *Anaplasma phagocytophilum*,
16 bactéria intracelular obrigatória que infecta neutrófilos. Baseados em análises moleculares o
17 agente da Erliquiose Granulocítica Humana (EGH), *Ehrlichia equi* e *Ehrlichia phagocytophila*,
18 foram reagrupados em uma única espécie: *Anaplasma phagocytophilum* (DUMLER *et al.*,
19 2001; VON LOEWENICH *et al.*, 2003).

20 A primeira descrição em equinos foi realizada em 1969 na Califórnia, Estados Unidos
21 (GRIBBLE, 1969; STANNARD *et al.*, 1969) e em seres humanos em 1994, também nos
22 Estados Unidos (BAKKEN *et al.*, 1994). Em equinos, já foi descrito caso clínico na Alemanha
23 (VON LOEWENICH *et al.*, 2003) e levantamentos sorológicos foram realizados no Brasil

1 (SALVAGNI *et al.*, 2010), Dinamarca (HANSEN *et al.*, 2010), Espanha (DE LA FUENTE *et*
2 *al.*, 2005) e Suíça (PUSTERLA *et al.*, 1999).

3 No Brasil, por se tratar de uma doença emergente, pouco se sabe sobre sua epidemiologia,
4 fisiopatologia e transmissão. Em um levantamento clínico sorológico na região centro – oeste
5 do Brasil, Salvagni *et al.* (2010) encontraram uma prevalência de 65% de equinos positivos
6 para *A. phagocytophilum* pelo teste de ELISA. Apesar disto, nenhum equino foi positivo pelo
7 exame microscópico de capa leucocitária ou nested PCR (nPCR).

8 A anaplasmose granulocítica é caracterizada por sinais clínicos de hipertermia, anorexia,
9 depressão, edema de membros, ataxia e baixa mortalidade. Corpúsculos de inclusão em
10 neutrófilos, leucopenia, trombocitopenia e anemia leve são as alterações hematológicas mais
11 relatadas (GRIBBLE, 1969; SALVAGNI *et al.*, 2010).

12 O diagnóstico da AGE é realizado por meio dos sinais clínicos e presença de inclusões
13 intracitoplasmáticas em neutrófilos (STANNARD *et al.*, 1969; DE LA FUENTE *et al.*, 2005;
14 SALVAGNI *et al.*, 2010). Métodos sorológicos como ELISA, Reação de Imunofluorescência
15 indireta (RIFI) são utilizados para diagnóstico do agente (DE LA FUENTE *et al.*, 2005;
16 HANSEN *et al.*, 2010; SALVAGNI *et al.*, 2010). A reação de Imunofluorescência indireta é
17 considerado um bom método de diagnóstico para o *A. phagocytophilum* (ZIMMERMAN E
18 CRISMAN, 2008).

19 O presente trabalho teve por objetivo realizar um levantamento sorológico utilizando-se do
20 exame da reação de imunofluorescência indireta e a avaliação do esfregaço de capa leucocitária
21 como métodos diagnósticos, a fim de se avaliar a situação da doença em equinos de tração do
22 “Projeto Carroceiros” do município de Belo Horizonte, Minas Gerais.

23 Material e Métodos

1 O experimento foi conduzido de acordo com os conceitos e preceitos éticos, após aprovação no
2 CEUA UFMG sob protocolo nº 167/2013. Os proprietários assinaram termo de consentimento
3 para utilização dos animais nesta pesquisa.

4 Foram utilizados 224 animais de tração oriundos de Belo Horizonte, Minas Gerais. Tais animais
5 são pertencentes aos carroceiros do município, devidamente inscritos no projeto de extensão
6 “Correção Ambiental e Reciclagem com Carroceiros de Belo Horizonte” (Projeto Carroceiros).
7 Este é um projeto de extensão da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas
8 Gerais em parceria com a Prefeitura Municipal de Belo Horizonte. Semanalmente são
9 realizadas visitas às Unidades de Recolhimento de Pequenos Volumes (URPVs), nas quais os
10 carroceiros depositam entulhos da construção civil, madeira, podas de árvores e jardins, pneus
11 e móveis descartados.

12 Durante as visitas os estudantes de graduação do curso de Medicina Veterinária realizam o
13 cadastramento e marcação, após a realização de um questionário socioeconômico com o
14 proprietário. Os animais recém-cadastrados e os previamente cadastrados recebem vacinação
15 antirrábica e são feitas as coletas de sangue para realização de exames sorológicos e
16 hematológicos. Além da vacinação dos animais, os carroceiros têm direito a assistência médico
17 veterinária por menores custos no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da
18 Universidade Federal de Minas Gerais (HV-EV/UFMG).

19 O município de Belo Horizonte é dividido, desde 1983, em nove unidades administrativas,
20 denominadas Regionais. As amostras utilizadas no estudo são provenientes de oito Regionais
21 Administrativas, com exceção da Regional Centro-Sul, devido ao fato de os carroceiros serem
22 proibidos de circularem dentro do perímetro urbano delimitado pela Avenida do Contorno.

23 A coleta do sangue foi realizada por meio de venulopunção da jugular externa, após contenção
24 dos animais em tronco e antissepsia do local, utilizando algodão embebido em álcool 70%.

1 Foram coletados dois tubos a vácuo, sendo um deles sem anticoagulante e outro contendo ácido
2 etilenodiamônio tetra-acético (EDTA).

3 O sangue do tubo contendo EDTA foi utilizado para confecção dos esfregaços de capa
4 leucocitária. Com o auxílio de uma centrífuga de microhematócrito foram preparados
5 microtubos, a capa leucocitária foi retirada dos microtubos após a quebra dos mesmos e o
6 esfregaço foi feito em lâminas de vidro para microscopia. As lâminas foram coradas utilizando-
7 se método de Romanowsky modificado e as lâminas de esfregaço de capa leucocitária foram
8 analisadas em microscopia óptica, em aumento de 1000 vezes e em objetiva de imersão para
9 procura de inclusões intracitoplasmáticas de *A. phagocytophilum* em neutrófilos. A leitura foi
10 feita em toda a extensão do esfregaço, totalizando a contagem de 100 neutrófilos. Foi
11 considerado positivo o animal que apresentasse inclusões intracitoplasmáticas,
12 independentemente do percentual de células infectadas.

13 Após a retração do coágulo, o tubo sem anticoagulante foi centrifugado a 3000 rotações por
14 minuto (rpm) (1106,82 x g), durante cinco minutos, e o soro obtido foi congelado a -20°C, em
15 pelo menos seis alíquotas de 0,5 ml, e destinados à soroteca do Projeto Carroceiros.

16 Foram utilizadas as amostras de soro congeladas a -20°C pertencentes à soroteca do Projeto
17 Carroceiros. Lâminas de vidro próprias para RIFI, contendo 12 poços que foram previamente
18 fixados com o antígeno proveniente do cultivo de *Anaplasma phagocytophilum* mantido em
19 IDE8 no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
20 Federal de Minas Gerais. A técnica utilizada para fabricação e fixação do antígeno foi adaptada
21 da descrita por Aguiar *et al.* (2007).

22 Após padronização prévia da técnica, as amostras foram diluídas na proporção de 1:160, em
23 salina fosfatada tamponada 1x (PBS 1x), que foi considerado o ponto de corte para a análise, e
24 então pipetadas nos poços. Permitiu-se que o soro diluído reagisse com o antígeno da lâmina
25 por 30 minutos, em câmara úmida a 37°C. Após esse tempo as lâminas passaram por três

1 lavagens, a primeira e a segunda com PBS 1x e a última com água destilada, sendo que, depois
2 de cada lavagem as lâminas foram submergidas em PBS 1x e água destilada, respectivamente,
3 durante três minutos. As lâminas foram secas a temperatura ambiente. Após secagem, foi
4 pipetado em cada poço, o conjugado anti IgG equina, previamente diluído em Azul de Evans
5 na proporção de 1:160, e repetiu-se a primeira reação exatamente como descrita acima. Ao
6 final, as lâminas foram cobertas com glicerina alcalina e lamínula e lidas em microscópio de
7 epifluorescência. As amostras foram consideradas positivas, quando, à microscopia de
8 fluorescências o antígeno apresentou fluorescência, na diluição de 1:160, que foi utilizada como
9 ponto de corte neste experimento. Utilizou-se PBS 1x como o branco e o soro de um animal
10 sabidamente positivo para o agente foi utilizado como controle positivo para todas as reações.
11 Após a triagem, as amostras consideradas positivas, foram novamente diluídas para se avaliar
12 a titulação do IgG desses animais. As diluições utilizadas foram 1:320, 1:640 e 1:1280.
13 O resultado do teste diagnóstico de RIFI foi utilizado para o cálculo da soroprevalência para *A.*
14 *phagocytophilum*. A prevalência foi calculada pela fórmula: nº total de casos/população total
15 estudada. E a incidência cumulativa foi calculada pela fórmula: nº de casos novos/população
16 inicial em risco de infecção.

17 Resultados e Discussão

18 Encontrou-se uma frequência de 53,57% (120/224) de animais positivos à diluição de 1:160. A
19 maior frequência foi na Regional Oeste (83,33%) e a menor na Pampulha (36,67%). Foram
20 observadas variações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as frequências da regional
21 Oeste e Venda Nova e entre as Regionais Venda Nova e Leste, Nordeste, Barreiro, Noroeste,
22 Norte e Pampulha. A distribuição de animais, de acordo com as regionais, está apresentada na
23 Tab. 1.

24 A maioria das amostras (41,47%) apresentou uma diluição de 1:160, tais amostras foram então
25 submetidas à titulação nas diluições de 1:320, 1:640 e 1:1280. As Regionais Oeste e Venda

1 Nova apresentaram grande número de animais positivos com titulação predominantemente
2 entre 1:160 e 1:320. Nas Regionais Leste e Norte, houve uma alta prevalência de animais com
3 título acima de 1:640. A distribuição das titulações de acordo com as Regionais está apresentada
4 na Tab. 2.

5 Com exceção das Regionais Norte e Leste, todas as Regionais apresentaram maior frequência
6 de animais apresentando títulos mais baixos, apesar disto não se pode caracterizar estas como
7 áreas de estabilidade enzoótica devido à porcentagem de amostras consideradas positivas, que
8 deveriam estar acima de 80%.

9 O percentual de animais sororreagentes com títulos acima de 1:640 foi de 41,18% e 50,00%
10 nas Regionais Leste e Norte, respectivamente. Franzén *et al.* (2005) descreveram o pico da
11 titulação entre
12 três a sete dias após a soroconversão, correspondendo ao período entre 12 a 16 dias após
13 infecção experimental. O que pode ser extrapolado para a situação em estudo e descrever os
14 animais destas regionais com animais em fase de convalescença. Além disso, como as amostras
15 foram obtidas durante o horário de trabalho dos animais, provavelmente os animais
16 considerados positivos não apresentavam sintomatologia grave da doença.

17 Não foi possível realizar um exame clínico detalhado dos animais durante as visitas realizadas
18 às URPVs, sendo os principais motivos falta de infraestrutura adequada e a grande quantidade
19 de animais que devem passar pela vacinação e marcação. A falta desse exame clínico torna
20 difícil a comparação entre os valores das titulações e a presença ou não de sintomatologia
21 clínica. Vale ressaltar também que, como a coleta realizada foi pontual, não foi possível o
22 acompanhamento dos animais e dos valores das titulações.

23 Durante a avaliação das lâminas de capa leucocitária uma amostra foi considerada perdida e,
24 assim, foram avaliadas 223 lâminas de esfregaço de capa leucocitária. Dentre os animais
25 avaliados pelo esfregaço de capa leucocitária 3,14% (7/223) possuíam inclusões indicativas da

1 presença do agente. A Regional com o maior número de animais positivos foi a Norte (10,00%
2 - 3/30). As regionais Barreiro, Leste, Noroeste e Oeste não apresentaram nenhum animal
3 considerado positivo, neste exame.

4 A baixa prevalência do exame direto encontrada no presente trabalho foi devida a coleta
5 pontual. Segundo a literatura (STANNARD *et al.*, 1969; BUTLER *et al.*, 2008), as mórulas são
6 normalmente encontradas durante a fase aguda e febril da doença. Durante os cursos e palestras
7 ministradas, os carroceiros são orientados a não trabalharem com animais apresentando
8 qualquer sintomatologia clínica. Recomenda-se encaminhá-los ao Hospital Veterinário da
9 Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-EV/UFMG), onde serão
10 devidamente avaliados e
11 tratados de forma mais adequada. Assim, como as coletas foram realizadas nas URPVs e não
12 no HV-EV/UFMG, o
13 número de animais com sintomatologia clínica e conseqüentemente com presença de
14 neutrófilos circulantes infectados, foi muito baixo.

15 Conclusão

16 Pode-se concluir que a infecção por *A. phagocytophilum* está presente em cavalos pertencentes
17 ao “Projeto Carroceiros” no município de Belo Horizonte. Para que se entenda melhor qual a
18 importância epidemiológica desta infecção para o município mais levantamentos sorológicos e
19 moleculares, em equinos, devem ser realizados a fim de se entender melhor a dinâmica do
20 agente na população equina.

21 Conflito de interesses

22 Não há.

23 Comitê de ética

24 O projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEUA UFMG sob protocolo nº 167/2013.

25

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

21 Referências

22 AGUIAR, D.M.; SAITO, T.B.; HAGIWARA, M.K.; MACHADO, R. Z.; LABUNA, M. B.
23 Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*.
24 **Ciência Rural**, v. 37, n.3, p. 796-802, 2007.

1 BAKKEN, J.S.; DUMLER, J.S.; CHEN, S. Human Granulocytic Ehrlichiosis In The Upper
2 Midwest United States. A new species emerging? **JAMA**, v. 272, n. 3, p. 212-218, 1994.

3 BUTLER, C.M.; NIJHOF, A.M. JONGEJAN, F.; VAN DER KOLK, J. H. *Anaplasma*
4 *phagocytophilum* infection in the Netherlands. **The Veterinary Record**, v. 162, p. 216-218,
5 2008.

6 DE LA FUENTE, J.; NARANJO, V.;
7 RUIZ – FONS, F.; HÖFLE, U.; FERNANDEZ DE MERA, I, G.; VILLANUA, D.;
8 ALMAZÁN, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; KOCAN, K. M.; GORTAZÁR, C. Potencial
9 vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A.*
10 *phagocytophilum* in central Spain. **Vector – borne and zoonotic diseases**, v. 5, n. 4, p. 390-
11 401, 2005.

12 DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S.
13 C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families
14 *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of
15 *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*,
16 descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HE agent’
17 as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic**
18 **and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

19 FRANZÉN, P.; ASPAN, A.; EGENVALL, A.; GUNNARSSON, A.; ÅBERG, L.; PRINGLE,
20 J. Acute clinical, hematological, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses
21 experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. **Journal of**
22 **Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 2, p. 232-239, 2005.

23 GRIBBLE, D.H. Equine Ehrlichiosis. **JAVMA**, 155: 462-469, 1969.

1 HANSEN, M.G.B.; CHRISTOFFERSEN, M.; THUESEN, L.R.; PETERSEN, M. R.;

2 BOJESEN, A. M. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma*

3 *phagocytophilum* in Danish horses. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, n. 3, p. 1 – 6, 2010.

4 PUSTERLA, N.; LEUTENEGGER, C.M.; CHAE, J.; LUTZ, H.; KIMSEY, R. B.; DUMLER,

5 J. S.; MADIGAN, J. E. Quantitative evaluation of ehrlichial burden in horses after experimental

6 transmission of Human granulocytic Ehrlichia Agent by intravenous inoculation with infected

7 leucocytes and by infected ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 4042-4044,

8 1999.

9 SALVAGNI, C.A.; DAGNONE, A.S.; GOMES, T.S.; MOTA, J. S.; ANDRADE, G. M.;

10 BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z. Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis

11 in horses from central West Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n,

12 3, p. 135 – 140, 2010.

13 STANNARD, A.A.; GRIBBLE. D.H.; SMITH, R.S. Equine Ehrlichiosis: A disease with

14 similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever. **The Veterinary Record**, v. 84, n.

15 6, p. 149-150, 1969.

16 VON LOEWENICH, F.D.; STUMPF, G.; BAUMGARTEN, B.U.; RÖLLINGHOFF, M.;

17 DUMLER, J. S.; BOGDAN, C. A case of Equine Granulocytic Ehrlichiosis provides molecular

18 evidence for the presence of pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* (HE agent) in Germany.

19 **European Journal of Microbiology and Infectious Disease**, v. 22, n. 5, p. 303-305, 2003.

20 ZIMMERMAN, K.L.; CRISMAN, M.V. Diagnostic Equine Serology. **Veterinary Clinics of**

21 **North America: Equine**, v. 24, n. 2, p. 311-334, 2008.

22 Tabela 1: Distribuição da frequência de animais reagentes para *Anaplasma phagocytophilum* de acordo

23 com a Regional Administrativa de Belo Horizonte.

Regional	Amostras Reativas	
	%	n
Barreiro	45,00 ^c	(9/20)

Leste	56,67 ^{BC}	(17/30)
Nordeste	50,00 ^C	(15/30)
Noroeste	43,33 ^C	(13/30)
Norte	40,00 ^C	(12/30)
Oeste	83,33 ^A	(20/24)
Pampulha	36,67 ^C	(11/30)
Venda Nova	76,67 ^{AB}	(23/30)
Total	53,57	(120/224)

1 Percentuais seguidos por letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($p < 0,05$).

2

3 Tabela 2: Distribuição das amostras reativas na RIFI, de acordo com a Regional e a diluição do soro,
4 em investigação de soroprevalência equina para *Anaplasma phagocytophilum*.

Regional	Titulação das amostras reativas (% , n)			
	1:160	1:320	1:640	1:1280
Barreiro	44,44 (4/9)	44,44 (4/9)	0,00 (0/9)	11,11 (1/9)
Leste	41,18 (7/17)	17,65 (3/17)	23,53 (4/17)	17,65 (3/17)
Nordeste	26,67 (4/15)	53,33 (8/15)	6,67 (1/15)	13,33 (2/15)
Noroeste	61,54 (8/13)	15,38 (2/13)	23,08 (3/13)	0,00 (0/13)
Norte	16,67 (2/12)	33,33 (4/12)	25,00 (3/12)	25,00 (3/12)
Oeste	65,00 (13/20)	15,00 (3/20)	15,00 (3/20)	5,00 (1/20)
Pampulha	54,55 (6/11)	27,27 (3/11)	0,00 (0/11)	18,18 (2/11)
Venda Nova	26,09 (6/23)	43,48 (10/23)	21,74 (5/23)	8,70 (2/23)
Total	41,47 (50/120)	30,83 (37/120)	15,83 (19/120)	11,67 (14/120)

5