

## DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA *ANAPLASMA* SP. EM PEQUENOS RUMINANTES NO SEMI-ÁRIDO DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

RAFAEL A. N. RAMOS<sup>1</sup>; CARLOS A. N. RAMOS<sup>2</sup>; FLÁBIO R. ARAÚJO<sup>3</sup>; ELAINE S. P. MELO<sup>2</sup>; ANTÔNIO A. S. M. TEMBUE<sup>4</sup>; MARIA A. G. FAUSTINO<sup>5</sup>; LEUCIO C. ALVES<sup>5</sup>; GRÁCIA M. S. ROSINHA<sup>3</sup>; CARINA ELISEI<sup>6</sup>; CLEBER O. SOARES<sup>3</sup>

**ABSTRACT:-** RAMOS, R.A.N.; RAMOS, C.A.N.; ARAÚJO, F.R.; MELO, E.S.P.; TEMBUE, A.A.S.M.; FAUSTINO, M.A. G.; ALVES, L.C.; ROSINHA, G.M.S.; ELISEI, C.; SOARES, C.O. [**Detection of antibodies against *Anaplasma* sp. in small ruminants from the semi-arid region against Pernambuco State, Brazil**]. Detecção de anticorpos para *Anaplasma* sp. em pequenos ruminantes no semi-árido do Estado de Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 2, p. 115-117, 2008. Embrapa Gado de Corte, Br 262, Km 04, CP 154, Campo Grande, MS 79002-970, Brasil. E-mail: flabio@cnpqg.embrapa.br

This paper reports the detection of antibodies against *Anaplasma* sp. in goats and sheep from the semi-arid region from Pernambuco State, Brazil, using an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant MSP5 of *Anaplasma marginale*. Sera from 243 goats and 68 sheep from Ibimirim municipality were analyzed and frequencies of antibodies of 11.93% (29/243) and 16.17% (11/68) were found for goats and sheep, respectively. The epidemiological relevance of the findings was discussed.

KEY WORDS: anaplasmosis, goat, sheep, ELISA, recombinant MSP5.

### RESUMO

Neste trabalho é descrita a detecção de anticorpos para *Anaplasma* sp. em caprinos e ovinos da região do semi-árido do Estado de Pernambuco, Brasil, utilizando-se um ensaio de imunoadsorção enzimática baseado em MSP5 recombinante de *Anaplasma marginale*. Foram analisados soros de 243 caprinos e 68 ovinos provenientes do município de Ibimirim, e observadas frequências de anticorpos de 11,93% (29/243) e 16,17% (11/68) para caprinos e ovinos, respectivamente. A importância epidemiológica dos achados foi discutida.

PALAVRAS-CHAVE: Anaplasmoze, caprino, ovino, ELISA, MSP5 recombinante.

*Anaplasma* sp. é uma bactéria intracelular obrigatória que infecta bovinos (*Anaplasma marginale*, *A. centrale* e *A. bovis*) e pequenos ruminantes (*A. ovis*) (KUTTLER et al., 1984). O gênero *Anaplasma* pertence a ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001). Recentemente, Dumler et al. (2001) propuseram a reorganização da ordem Rickettsiales e foram incluídos ao gênero *Anaplasma* algumas espécies do gênero *Ehrlichia*. Desta forma, passaram a ser incluídas ao gênero *Anaplasma* as espécies: *A. phagocytophilum*, que infecta e causa doença em uma grande variedade de hospedeiros (humanos, caninos, bovinos, eqüídeos e pequenos ruminantes) e *A. bovis*, recentemente, descrita infectando bovinos na microrregião de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil (SANTOS; CARVALHO, 2006).

A distribuição das espécies de *Anaplasma* que infectam pequenos ruminantes, principalmente *A. ovis*, tem sido relatada em vários países da Europa (HORNOK et al., 2007), África, Estados Unidos (NDUNG'U et al., 1995) e Ásia (LIU et

<sup>1</sup> Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil.

<sup>2</sup> Mestrado em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>3</sup> Embrapa Gado de Corte, BR 262. Km 04, CP 154, Campo Grande, MS 79002-970. E-mail: flabio@cnpqg.embrapa.br

<sup>4</sup> Mestrado em Ciências Veterinárias, UFRPE, Recife, Brasil.

<sup>5</sup> Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

<sup>6</sup> Bolsista DCR Cnpq/FUNDECT/Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil.

al., 2005). No entanto, nos países da América do Sul, dentre os quais o Brasil, a ocorrência de anaplasmoze em pequenos ruminantes são escassos (MOTA et al., 1996).

Pesquisas sobre as proteínas de membrana externa de *Anaplasma* sp. têm possibilitado o desenvolvimento de ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA), baseados em proteínas recombinantes de *A. marginale* (ARAÚJO et al., 2005), dentre as quais MSP5 (SILVA et al., 2006). Essas pesquisas têm oferecido também uma grande gama de informações sobre a conservação dessas proteínas no gênero (DREHER et al., 2005; STRIK et al., 2007), inclusive com reações sorológicas cruzadas descritas entre MSP5 de *A. marginale*, *A. centrale*, *A. phagocytophilum* e *A. ovis* (DREHER et al., 2005), e entre MSP5 de *A. phagocytophilum* e *A. platys*, *Ehrlichia canis* e *E. chaffeensis* (STRIK et al., 2007).

Com o objetivo de pesquisar anticorpos para *Anaplasma* sp. em caprinos e ovinos da região do semi-árido do Estado de Pernambuco, foram obtidas amostras de soro de 243 caprinos e 68 ovinos provenientes do município de Ibitimir.

A detecção dos anticorpos foi realizada utilizando-se um ensaio de ELISA, baseado em MSP5 recombinante de *A. marginale* (MELO, 2006), adaptado para ovinos e caprinos. Para isto, foram utilizadas microplacas Greiner Bio One (Microlon, 655101), e as diluições ótimas de antígeno, soros, conjugado e tampões, assim como o tempo de parada da reação foi avaliado testando-se três soros pré-ímmunes e três soros ímmunes provenientes de dois ovinos e um caprino. Os animais, clinicamente saudáveis foram inoculados três vezes por via subcutânea, com aproximadamente 1 µg de lisado de corpúsculo inicial de *A. marginale* (isolado Pernambuco – Zona da Mata) com intervalos de sete dias. A primeira inoculação foi realizada com o adjuvante MPL + TDM + CWS (Sigma, M-6661) conforme instruções do fabricante, e as inoculações subseqüentes foram feitas com adjuvante incompleto de Freund (Sigma, F-5506) também conforme instruções do fabricante.

O protocolo de inoculação utilizado mostrou-se eficaz na produção de anti-soro específico de caprino e ovino contra MSP5 de *A. marginale*. Os soros ímmunes dos ovinos apresentaram densidades ópticas médias 2,6 a 5,5 vezes superiores aos respectivos soros pré-ímmunes. Com relação ao caprino, a densidade óptica do soro ímmune superou em apenas duas vezes a do soro pré-ímmune. Isso representa uma alternativa para o desenvolvimento de anti-soro específico de caprino e ovino, para utilização como controles em ensaios sorológicos, em regiões nas quais não se dispõe de soros de animais reconhecidamente infectados.

Com relação à frequência de anticorpos dos caprinos e ovinos avaliados, 11,93% (29/243) e 16,17% (11/68), respectivamente, apresentaram anticorpos para MSP5. Esses resultados foram inferiores aos encontrados por Ndung'u et al. (1995) em regiões da África, aos encontrados por Razmi et al. (2006) no Irã (80,30% em caprinos, 47,53% em ovinos) e Hornok et al. (2007) na Hungria (99,40% em ovinos).

A possível explicação para a baixa frequência de anticorpos encontrada pode estar relacionada às condições climáticas adversas da região e sua influência sobre a biologia reprodutiva dos carrapatos vetores (KESSLER; SCHENK, 1998). Apesar disso, esses resultados são relevantes sob dois aspectos principais: i) por ser o primeiro relato sobre a detecção de anticorpos para MSP5 de *A. marginale* em caprinos e ovinos no Brasil; ii) e a presença desses anticorpos sugere que algumas espécies de *Anaplasma* e/ou de *Ehrlichia* que infectam pequenos ruminantes estão presentes na região.

Atualmente, reconhece-se que, devido à conservação da proteína MSP5 na família Anaplasmataceae, os ensaios sorológicos que utilizam essa proteína como antígeno não são capazes de distinguir infecções causadas por *Anaplasma* sp. ou *Ehrlichia* sp., principalmente se utilizados para animais passíveis de infecção por mais de uma espécie (DREHER et al., 2005). No entanto, representam importantes ferramentas de triagem para detecção das infecções por *Anaplasma/Ehrlichia* em diversos hospedeiros (STRIK et al., 2007).

Estudos futuros utilizando ferramentas moleculares são necessários para especificar quais agentes (*Anaplasma/Ehrlichia*) induziram a formação de anticorpos para MSP5 nos caprinos e ovinos da região do semi-árido pernambucano. Os resultados apresentados demonstram indício da presença de *A. ovis* e/ou *A. phagocytophilum*, infectando caprinos e ovinos, no território nacional.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, F. R.; MELO, V. S. P.; RAMOS, C. A. N.; MADRUGA, C. R.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H.; ALMEIDA, N. F.; ARAÚJO, G. S.; TORRES, R. A. A. JR.; FRAGOSO, S. P.; ARAUCO, P. R. C.; BACANELLI, G.; OLIVEIRA, M. B.; SANTOS, L. R. Development of enzyme-linked immunosorbent assays based on recombinant MSP1a and MSP2 of *Anaplasma marginale*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 7, p. 765-769, 2005.
- DREHER, U. M.; DE LA FUENTE, J.; HOFMAM-LEHMANN, R.; MELI, M. L.; PUSTERLA, N.; KOCAN, K. M.; WOLDEHIWET, Z.; BRAUN, U.; REGULA, G.; STRAERK, K. D. C.; LUTZ, H. Serologic cross-reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 2, n. 10, p. 1177-1183, 2005.
- DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

- KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. *Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos*. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 1998. 157 p.
- KUTTLER, K. L. Anaplasma infection in wild and domestic ruminants: a review. *Journal Wildlife Disease*, v. 20, n. 1, p. 12-20, 1984.
- HORNOK, S.; ELEK, V.; DE LA FUENTE, J.; NARANJO, V.; FARKAS, R.; MAJOROS, G.; FOLDVÁRI, G. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *Veterinary Microbiology*, v. 122, n. 3-4, p. 316-322, 2007.
- LIU, Z.; LUO, J.; BAI, Q.; MA, M.; GUAN, G.; YIN, H. Amplification of 16S rRNA genes of anaplasma species in china for phylogenetics analysis. *Veterinary Microbiology*, v. 107, n. 1-2, p. 145-148, 2005.
- MELO, E. S. P. *Ensaio de imunoabsorção enzimática com MSP5 recombinante truncada para a detecção de anticorpos contra Anaplasma marginale em bovinos*, 2006. 54 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2006.
- MOTA, R. A.; SOARES, P. C.; SILVA, F. F.; SOARES, C. O.; LOPES, C. W. G.; MASSARD, C. L. Babesiose e anaplasmosse caprina no estado de Pernambuco. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIA VETERINÁRIA, 15., 1996, Campo Grande, *Resumos ...* [Campo Grande]: Associação Panamericana de Ciências Veterinárias, 1996. p. 302.
- NDUNG'U, L. W.; AGUIRRE, C.; RURANGIRWA, F. R.; MCELWAIN, T. F.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, D.; PALMER, G. H. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal Clinical Microbiology*, v. 33, n. 3, p. 675-679, 1995.
- RAZMI, G. R.; DASTJERDI, K.; HOSSIENI, H.; NAGHIBI, A.; BARATI, F.; ASLANI, M. R. An epidemiological study on *Anaplasma* infection in cattle, sheep, and goats in Mashhad suburb, Khorasan Province, Iran. *Annals of the New York Academy Science*, v. 1078, p. 479-781, 2006.
- SANTOS, C. F.; CARVALHO, C. B. Primeiro relato de *Anaplasma bovis* (Donatien e Lestoquard, 1936) Dumler et al. (2001) na microrregião de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 15, n. 3, p. 126-127, 2006.
- SILVA, V. M. G.; ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R. M.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H.; ALMEIDA, M. A. O.; FRAGOSO, S. P.; SANTOS, L. R.; RAMOS, C. A. N.; BACANELLI, G.; TORRES JÚNIOR, R. A. A. Comparison between indirect enzyme-linked immunosorbent assays for *Anaplasma marginale* antibodies with recombinant major surface protein 5 and initial body antigens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 5, p. 511-516, 2006.
- STRIK, N. I.; ALLEMAN, A. R.; BARBET, A. F.; SORENSON, H. L.; WAMSLEY, H. L.; GASCHEN, F. P.; LUCKSCHANDER, N.; WONG, S.; CHU, F.; FOLEY, J. E.; BJOERSDORFF, A.; STUEN, S. Characterization of *Anaplasma phagocytophilum* major surface proteins 5 and the extent of its cross-reactivity with *A. marginale*. *Clinical Vaccine Immunology*, v. 14, n. 3, p. 262-268, 2007.

Recebido em 27 de setembro de 2007.

Aceito para publicação em 09 de abril de 2008.