

INFLUÊNCIA DA TRANSMISSÃO TRANSPLACENTÁRIA DO *ANAPLASMA MARGINALE* NO HEMOGRAMA E NO METABOLISMO OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS (NBT) EM BOVINOS

Tamires Soares de Assis¹; Nívea Caroline M. Silva¹; Marcos Roberto A. Ferreira¹; Cecília Nunes Moreira²

1- Alunos (as) do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás – CAJ.

2- Professor Adjunto do Curso de Medicina Veterinária, CAJ/UFG, Jataí, Goiás, Brasil. CEP:75800-000.

E-mail: cissanm@yahoo.com.br (autor correspondente)

PALAVRAS-CHAVE: Leucograma, nitroblue tetrazolium, parto.

ABSTRACT

INFLUENCE OF TRANSPLACENTAL TRANSMISSION OF ANAPLASMOSIS ON HEMOGRAM AND NEUTROPHILS OXIDATIVE METABOLISM PARAMETERS (NBT) IN CATTLE

This study determines the dynamics of transplacental infection by *Anaplasma marginale* in calves through assessment of hematological parameters and functional neutrophil activity by the NBT method. The animals investigated were reared in a dairy farm called “Fazenda Santa Rosa” located at Universidade Federal de Goiás, Jataí Campus, southwest of Goiânia, Goiás State. Blood smear tests were carried out to diagnose *A. marginale*. They showed that 71,43% of cows and 42,85% of calves were positive for anaplasmosis. As regards hemogram analysis, evidence revealed prepartum leukocytosis and decrease in leukocytes in the postpartum period due to stress during parturition. Transplacental transmission of *A. marginale* was detected in all cases and the infected calves presented an increase in neutrophils oxidative metabolism on their first day of life.

KEYWORDS: Leucocyte count, nitroblue tetrazolium, parturition.

INTRODUÇÃO

A anaplasnose é causada por uma rickettsia intra-eritrocitária, gênero *Anaplasma*, que infecta ruminantes domésticos e alguns silvestres. O *A. marginale* é transmitido biológica e mecanicamente por um grupo diversificado de artrópodes, insetos hematófagos e instrumentos contaminados. O carrapato *Rhipicephalus boophilus microplus* é o principal

transmissor no Brasil. A forma transplacentária em infecções agudas pode ocorrer, ocasionando a anaplasnose neonatal. O período de incubação varia de duas a doze semanas. Os sinais clínicos são: febre, anemia, perda de peso, queda na produção, aborto e, eventualmente, morte (PEREIRA, 2006).

Os animais que sobrevivem à infecção aguda permanecem infectados por vários anos, servindo de importantes reservatórios com níveis microscópicos indetectáveis de eritrócitos infectados. Os métodos de profilaxia empregados para a anaplasnose são: o controle de dípteros hematófagos, medidas de controle de carrapatos, porém, o carrapato não deve ser erradicado da propriedade, e sim controlado, de forma que os animais sejam parasitados durante todo o ano com infestações baixas, permitindo assim doses infectantes adequadas; e o uso de vacinas (FRASER et al, 1997).

A imunidade conferida a *A. marginale* é de duração variável e de origem humoral e celular. O aumento da produção de substâncias oxidativas no interior do neutrófilo é fundamental para a eficiência deste processo de defesa (TIZARD, 2000). O teste da redução do nitroblue tetrazolium (NBT) foi um método desenvolvido para a determinação desta atividade oxidativa dos neutrófilos (BAEHNER & NATHAN, 1968).

O objetivo deste estudo foi determinar a dinâmica de infecção transplacentária por *Anaplasma marginale* em bezerros e suas mães, avaliando parâmetros hematológicos encontrados no hemograma e relacionando a atividade funcional neutrofílica avaliada pelo método NBT.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido na propriedade rural Fazenda Santa Rosa, da Universidade Federal de Goiás – Campus Jataí, situada na região Sudoeste do Estado de Goiás, no município de Jataí. Foram coletadas amostras de sangue de 11 vacas girolando, 7 dias antes do parto e 24hs após o parto, e de seus bezerros 24hs depois do nascimento. A colheita foi realizada por punção da veia jugular com anticoagulante EDTA, a 10%, obtendo 5ml de sangue, para a determinação do volume globular (COLES, 1984), proteína total por refratometria, fibrinogênio plasmático pela técnica de precipitação no tubo de micro hematócrito a 56°C, contagem total de hemácias e de leucócitos com utilização de câmara de Neubauer e dosagem de hemoglobina pelo método de cianometahemoglobina por espectrofotometria (JAIN, 1993).

Para a determinação do teste de NBT, foram obtidos 500 µL de sangue em tubos ependorf, contendo 2,0 µL de heparina (Roche, São Paulo, Brasil). Desta solução de NBT

foram pipetados e transferidos 50µL para frascos plásticos de e 50µL de sangue heparinizado, misturando-se as amostras com os reagentes, incubados a 37°C por 15 minutos em banho-maria e depois mais 15 minutos em temperatura ambiente (STIMULANT, USA). Em seguida, utilizando-se lâminas foram preparados esfregaços que foram corados pelo método de Leishman conforme JAIN (1993). Por meio de microscopia, com aumento de 1000X, para cada amostra foram contados 100 neutrófilos, discriminando o percentual de células NBT positivas ou negativas, no interior do citoplasma. Os esfregaços de sangue obtidos da veia jugular, fixados com álcool metílico, à temperatura ambiente e corados pelo método de Panótipo. Foram examinados em microscópio óptico, sob objetiva de imersão (100x), para o diagnóstico de *A. marginale*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação hematológica antes do parto, obteve-se os seguintes valores na série vermelha: hematócrito (32,4% ± 6,4%), hemácias (6,2 mm³ ± 0,61 mm³), fibrinogênio (525 g/dL ± 320 g/dL), proteínas plasmática (8,7g/dL ± 0,68g/dL), VCM (52,8 fl ± 5,9 fl), CHCM (33,3 g% ± 0,61g%) e , plaquetas, (316.625 mm³ ± 188.348 mm³). Quanto ao eritograma, no período pré-parto, 9,09% (1/11) das vacas apresentaram anemia, sendo que 100% foi do tipo normocítica e normocrômica, 45,45% (5/11) dos animais apresentaram trombocitopenia e 54,54% (6/11) contagem de plaquetas normais. Em relação às proteínas plasmáticas totais, 54,45% (6/11) apresentaram hiperproteinemia, enquanto 45,45% (5/11) tinham índices normais de proteínas.

Passando à análise da série branca, os valores médios obtidos foram: leucócitos totais (15.675 mm³ ± 5.715 mm³). No leucograma diferencial, os linfócitos (9.640 mm³ ± 6.104 mm³), segmentados (10.238 mm³ ± 11.620 mm³), bastonetes (402 mm³ ± 727 mm³). Com relação ao leucograma, no período pré-parto, 54,55% (6/11) dos animais apresentaram leucocitose e 45,45% (5/11) contagem de leucócitos normais; dos linfócitos, 45,45% (5/11) mostraram linfócitos normais e 54,55% (6/11) linfocitose. Em relação à contagem de neutrófilos totais, 54,55% (6/11) resultou em contagem normal e 45,45% (5/11) neutrofilia. Na contagem dos monócitos, 36,36% (4/11) apresentaram monocitose e 63,64% (7/11) contagem de monócitos normais. Evidenciou-se que 63,64% (7/11) apresentaram eosinofilia e 36,36% (4/11) contagem normal de eosinófilos.

Na avaliação hematológica após o parto, obteve-se os seguintes valores na série vermelha: hematócrito (33% ± 5,6%), hemácias (6,2 mm³ ± 0,60 mm³), fibrinogênio (2.188 g/dL ± 4.000 g/dL), proteínas plasmática (8,3 g/dL ± 0,66 g/dL), VCM (53,4 fl ± 4,16 fl),

CHCM ($33,3 \text{ g\%} \pm 0,42 \text{ g\%}$) e , plaquetas, ($362.286 \text{ mm}^3 \pm 167.305 \text{ mm}^3$). Quanto ao eritrograma pós-parto, 100% (11/11) das vacas apresentaram-se sem alterações, 27,27% (2/11) apresentaram trombocitopenia e 72,73% (8/11) contagem de plaquetas normais. Em relação às proteínas plasmáticas totais, 45,45% (5/11) apresentaram hiperproteinemia, enquanto 54,55% (6/11) apresentaram índices normais de proteínas.

No que se refere à série branca, leucócitos totais ($13.594 \text{ mm}^3 \pm 3.108 \text{ mm}^3$), no leucograma diferencial, os linfócitos ($8.051 \text{ mm}^3 \pm 3.360 \text{ mm}^3$), segmentados ($3.991 \text{ mm}^3 \pm 2.357 \text{ mm}^3$), bastonetes ($14 \text{ mm}^3 \pm 39 \text{ mm}^3$). Quanto ao leucograma pós-parto, 45,45% (5/11) dos animais apresentaram leucocitose, 54,55% (6/11) contagem de leucócitos normais. Quanto aos linfócitos, 36,36% (4/11) apresentaram linfopenia e 63,64% (7/11) contagem de linfócitos normais. Já na contagem de neutrófilos totais, 72,73% apresentaram contagem normal e 27,27% neutrofilia. Na contagem dos monócitos, 36,36% (4/11) apresentaram monócitopenia e 63,64% (7/11) estavam com contagens normais. Evidenciou-se que 9,09% (1/11) apresentaram eosinofilia, enquanto 90,91% (10/11) apresentaram índice normal de eosinófilos.

Na avaliação hematológica dos bezerros recém nascidos, obteve-se os seguintes valores na série vermelha: hematócrito ($36,3\% \pm 7,1\%$), hemácias ($6,5 \text{ mm}^3 \pm 0,74 \text{ mm}^3$), fibrinogênio ($1029 \text{ g/dL} \pm 293 \text{ g/dL}$), proteínas plasmática ($7,9 \text{ g/dL} \pm 0,98 \text{ g/dL}$), VCM ($55,3 \text{ fl} \pm 5,13 \text{ fl}$), CHCM ($33,4 \text{ g\%} \pm 0,40 \text{ g\%}$) e , plaquetas, ($298.120 \text{ mm}^3 \pm 67.038 \text{ mm}^3$).

No eritrograma e na contagem de plaquetas, 100% destes animais apresentaram resultados dentro dos parâmetros fisiológicos normais (MEYER et al., 1995). Em relação às proteínas plasmáticas totais, 18,18% (2/11) apresentaram hiperproteinemia e 72,72% (8/11) apresentaram índices normais de proteínas. Quanto a série branca, leucócitos totais ($10.214 \text{ mm}^3 \pm 3.818,2 \text{ mm}^3$), contagem diferencial de leucócitos, os linfócitos ($4.669 \text{ mm}^3 \pm 1.731,5 \text{ mm}^3$), segmentados ($3.853 \text{ mm}^3 \pm 2.543,8 \text{ mm}^3$), bastonetes ($142 \text{ mm}^3 \pm 130,5 \text{ mm}^3$). No leucograma dos bezerros, 54,55% (6/11) dos animais apresentaram contagem de leucócitos normais e 45,45% (5/11) leucocitose. Quanto aos linfócitos, 18,18% (2/11) apresentaram linfocitose e 72,72% (8/11) da contagem de linfócitos normais. Quanto a contagem de neutrófilos totais, 63,64% (7/11) apresentaram contagem normal e 36,36% neutrofilia. Quanto aos monócitos, 18,18% (2/11) apresentaram monocitose e 72,72% (8/11) contagem de monócitos normais. Evidenciou-se que 18,18% (2/11) apresentaram eosinofilia, 36,36% (4/11) apresentaram eosinopenia e 36,36% (4/11) contagem normal de eosinófilos.

Da análise do NBT, verificou-se que os valores médios antes do parto foram ($47\% \pm 0,17\%$), e depois do parto foram de $32\% \pm 0,17\%$; sendo que 54,45% (6/11) das vacas

apresentaram significativo decréscimo na porcentagem do NBT pós-parto, em relação à porcentagem do NBT pré-parto. E 45,45% (5/11) das vacas tiveram um aumento na sua porcentagem. Com relação aos bezerros, os valores médios de NBT foram de $41\% \pm 0,15\%$.

Quanto à parasitemia, 54,54% (6/11) das vacas foram positivas para *Anaplasma marginale*, dessas, 18,18% (2/11) foram positivas pré e pós-parto e 72,72% (8/11) positivas somente no pós-parto. Quanto aos bezerros, 45,45% (5/11) foram positivos para *A. marginale*.

As vacas no pré-parto demonstraram uma leucocitose e uma redução nos leucócitos pós-parto, porém não caracterizando uma leucopenia, pois os valores estavam dentro dos parâmetros normais. As vacas pós-parto, independente da parasitemia, apresentavam um decréscimo na imunidade celular refletindo uma queda no NBT de 47% para 32%, sendo esta justificada provavelmente por um estresse puerperal. As vacas que se mostraram parasitadas pelo *Anaplasma marginale* apresentaram um acréscimo de 36% para 47% no resultado do teste de NBT do pré-parto para o pós-parto, concordando com BIRGEL JUNIOR & SAUT (2006) e demonstrando a resposta imunológica a infecção. Os bezerros positivos para o *Anaplasma marginale* apresentaram maiores valores no resultado do teste de NBT do que os bezerros não parasitados, o que reflete já o pleno funcionamento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos nas primeiras horas de vida, concordando com TIZARD (2000).

Todos os bezerros que se mostraram positivos para *Anaplasma marginale* possuíam suas mães também parasitadas; comprovando a transmissão transplacentária do *Anaplasma marginale*, considerando que não houve tempo para contaminação dos bezerros recém-nascidos por vetores da anaplasnose bovina, concordando com SILVA (2007).

CONCLUSÕES

Foi possível concluir que a transmissão placentária do *A. marginale* ocorreu em todos os casos estudados e os bezerros infectados apresentaram já no primeiro dia de vida um acréscimo no metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

REFERÊNCIAS

- BAEHNER, R. L.; NATHAN, D. G. Chronic granulomatous disease. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 278, p. 1972-4, 1968.
- BIRGEL JUNIOR, E. H.; SAUT, J. P. E. Influência do período pós-parto sobre o leucograma de fêmeas bovinas da raça holandesa. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 588-597, 2006.

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1984, 566p.

ELSIEVO, K. A.; MOORE, W. E. Effects of dietary protein and stage of lactation on the hematology and erythrocyte enzymes activities of high-producing dairy cattle. **Research in Veterinary Science**, London, v. 26, n. 1, p. 53-58, 1979.

FRASER, C. M.; BERGERON, J. A.; MAYS, A.; AIELLO, S. E.; **Manual Merk de veterinária**. 7.ed. São Paulo: Rocca, 1997. 2169p.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417p.

MEYER, J. D.; COLES, H. E; RICH, J. L. **Medicina de laboratório veterinária Interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995.

PEREIRA, M. A. **Dinâmica da infecção por *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bezerras de propriedades leiteiras da microrregião de Lavras, Sul de Minas Gerais**. 58p. 2006. Dissertação (Mestre em Ciência Veterinária) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, R. A.; CORRÊA, F. N.; BOTTEON, R. C. C. M.; BOTTEON, P. T. L. Infecção natural por hemoparasitos em bezerros submetidos à quimio-profilaxia aos 30 dias de idade. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 163-165 2007.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology: an introduction**. 6.ed. London: Saunders Company, 2000, 482p.