

IMUNIDADE HUMORAL AOS AGENTES DA BABESIOSE DURANTE O SEGUNDO ANO DE VIDA DE BOVINOS EM ÁREA MARGINAL AO VETOR *BOOPHILUS MICROPLUS*

REINIGER, R.C.P.¹; FARIAS, N.A.R.²; SACCO, A.M.S.³; BENAVIDES, M.V.³

RESUMO

Avaliou-se, através da reação de imunofluorescência indireta, a presença de imunoglobulinas (classe IgG) anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* no soro de 31 bovinos, durante seu segundo ano de vida (13 aos 24 meses), produto da cruzamento de matrizes Santa Gertrudis com Polled Hereford, de um rebanho naturalmente infectado. A propriedade rural localiza-se ao sul do Rio Grande do Sul, tendo como situação geográfica: latitude 32° 01' 28", longitude 52° 55' 01". As coletas mensais de sangue foram acompanhadas de observação da presença do *Boophilus microplus*, bem como de dados climatológicos durante o ano do experimento. A temperatura e a umidade relativa do ar durante o período experimental mantiveram-se superiores às normais ao longo do ano, favorecendo a constância do carrapato no rebanho. A sorologia revelou que 100% dos bovinos apresentaram-se positivos para *B. bigemina* ao longo do experimento, enquanto que para *B. bovis*, esse índice só foi obtido a partir dos 17 meses de idade, após a infestação pela terceira geração de carrapatos (outono). Isso revela que foi mantida a situação de estabilidade enzoótica na propriedade, constatada durante o primeiro ano de vida destes animais, o que é atípico para região. Os bovinos mantiveram títulos de anticorpos significativamente inferiores aos observados durante o seu primeiro ano de vida, tanto para *B. bovis* (P=0,0002) como para *B. bigemina* (P<0,0001). A titulação de anticorpos para *B. bigemina* foi significativamente (P=0,0001) superior à verificada para *B. bovis*. Os resultados obtidos revelam a existência de situação de estabilidade enzoótica em uma área de instabilidade enzoótica para a babesiose bovina, e fornecem subsídios para o entendimento da maior frequência de casos clínicos ocasionados por *B. bovis* na região.

Palavras chaves: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, anticorpos, epidemiologia, imunofluorescência indireta.

¹ Laboratório de Análises Clínicas Veterinária, Universidade da Região da Campanha, Bagé, RS. Trabalho desenvolvido como parte da Dissertação de Mestrado em Parasitologia, Instituto de Biologia, UFPel. E-mail: reginareiniger@hotmail.com. Tel: 053 32428244 – ramal 212 ou 251. Universidade da Região da Campanha, Av Tupy Silveira, 2099, Bagé-RS, CEP 96400-110.

² Departamento Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, UFPel.

³ Centro de Pesquisa Pecuária Sul/Embrapa, Bagé, RS.

INTRODUÇÃO

A babesiose bovina, uma das doenças que fazem parte do complexo Tristeza Parasitária Bovina (TPB), é causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, parasitos intraeritrocitários do hospedeiro que causam destruição das células na corrente circulatória, levando o animal a uma anemia intensa (MAHONEY, 1977). Na América do Sul a babesiose é transmitida exclusivamente pelo carrapato *Boophilus microplus*, sendo um dos problemas sanitários de maior impacto econômico para bovinocultura (MARTINS, 2005). O Rio Grande do Sul, por apresentar invernos com baixas temperaturas, não favorecendo o ciclo de vida livre do vetor (GONZALES, 2003) é considerado como área de instabilidade enzoótica para esta doença. Isto significa surtos freqüentes da doença e, nestas áreas, o correto diagnóstico e imediato tratamento são essenciais para evitar ou diminuir ao máximo as perdas produtivas por esta hemoparasitose. Entretanto, mais importante que controlar os surtos é tomar medidas que visem a profilaxia e o controle da doença. Para a tomada de decisões e ações neste sentido, é imprescindível que se tenha o diagnóstico epidemiológico do problema na região e, mais especificamente, na propriedade (SACCO, 2002). O objetivo do presente trabalho foi delinear a situação epidemiológica da babesiose durante o segundo ano de vida de bovinos, através da técnica de Imunofluorescência Indireta, em uma propriedade localizada em área marginal para o vetor *Boophilus microplus*, próxima ao paralelo 32°S. Esta localização apresenta condições climatológicas que favorecem a infestação de carrapatos nos bovinos por somente alguns meses do ano, situação que geralmente determina o estado de instabilidade enzoótica para TPB.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no ano de 2001, na Fazenda Curupira, situada no município de Pedro Osório, RS, tendo como situação geográfica: latitude 32° 01' 28", longitude 52° 55' 01" e altitude média de 68 metros. O material analisado foi coletado de bovinos com idade de 13 a 34 meses, filhos de vacas da raça Santa Gertrudis inseminadas com sêmem de touro Polled Hereford. A análise sorológica para detecção de anticorpos anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* foi realizada no Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros (CPPSUL/EMBRAPA), em Bagé, RS.

Não houve alteração do manejo normal da propriedade durante a realização do experimento. O trabalho constou de coletas mensais de sangue dos animais para a obtenção de soro e determinação de hematócrito, além da obtenção de informações sobre o manejo, presença e controle de carrapatos nestes animais.

O sangue venoso foi colhido sem anticoagulante, centrifugado a 3000G por 10 minutos e o soro armazenado a -20°C até o processamento. O soro foi submetido à técnica de imunofluorescência indireta para detecção de imunoglobulinas (IgG) anti-*B. bovis* e *B. bigemina*, conforme descrita em IICA (1984) com algumas modificações. Os antígenos armazenados a -20°C foram fornecidos pelo Laboratório de Saúde Animal do CNPQC-Embrapa – Mato Grosso do Sul – MS. O conjugado utilizado foi do laboratório Sigma-Chemical. Também foram analisados os valores de hematócrito segundo a técnica de microhematócrito. A avaliação da infestação por *Boophilus microplus* dos animais do experimento foi realizada mensalmente, quando da coleta de sangue, onde apenas foi observada a presença ou ausência dos ixodídeos.

Os dados das normais climatológicas (período de 30 anos) e de médias mensais do ano de 2001 utilizados foram obtidos do Boletim Climatológico da Estação

Agroclimatológica de Capão do Leão – RS (EMBRAPA/ETB – Campus da UFPel). As variáveis analisadas foram: temperaturas médias, mínimas e máximas, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar.

Foram realizadas análises de estatística descritiva das titulações com o cálculo de média, moda, mediana, bem como freqüências (dados não transformados). Para a análise dos níveis de anticorpos *anti-B. bovis* e *anti-B. bigemina* foi necessária a transformação das titulações através de logaritmo decimal +1. A comparação entre os meses do ano foi realizada através de análise de variância e a comparação entre grupos de meses foi realizada através da opção de contrastes ortogonais dentro na análise de variância no programa estatístico SAS (SAS, 1989). Para uma melhor comparação entre os resultados de sorologia dos terneiros no primeiro ano de idade, foram utilizados os resultados obtidos por Krolow (2001), que avaliou esta mesma situação, nesta mesma propriedade, porém com animais do nascimento ao desmame.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados da infestação por carrapatos nos animais do experimento e as épocas de aplicação de carrapaticidas estão na Figura 1. A ausência de carrapato nos animais foi detectada apenas nos meses de fevereiro e maio, devido a tratamentos carrapaticidas, estando presente nos demais meses. A biologia de *B. microplus* está fortemente influenciada pela temperatura e as diferentes etapas da fase de vida livre são encurtadas pelas altas temperaturas e prolongadas pelas baixas temperaturas (GLORIA et al., 1993). Avaliando-se as variáveis dos últimos trinta anos, observou-se que durante o ano de 2001, as temperaturas médias foram superiores às normais, sendo que nos meses de inverno as médias de mínima, média e máxima estavam acima das normais climatológicas, favorecendo o ciclo de vida livre do carrapato (Figura 2). A umidade relativa do ar manteve-se superior às normais climatológicas, o que, juntamente com a temperatura elevada, também favoreceu o desenvolvimento do carrapato, conforme descrito para o desenvolvimento das fases de vida livre deste ixodídeo em Gonzales (2003).

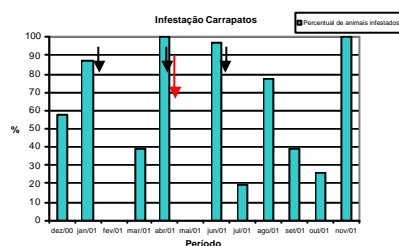


Figura 1 Percentual de animais infestados pelo carrapato ao longo do ano.

Não houve casos clínicos de babesiose durante a realização do experimento, e também não ocorreu redução dos valores normais do hematócrito para espécie bovina (24 – 48%) neste mesmo período. Os resultados das provas sorológicas demonstraram que, aos dois anos de idade, 100% dos animais apresentaram anticorpos *anti-B. bovis* e *B. bigemina*, sendo que este último já vinha sendo mantido durante todo o período experimental. Estes resultados enfatizam a situação de estabilidade enzoótica já constatada nesta propriedade por Krolow (2002), apesar de estar localizada em região definida como de instabilidade enzoótica por Olivé Leite et al. (1989) e Artiles et al.

(1995). É possível que, além das condições climáticas já comentadas, este fato esteja relacionado com o manejo da propriedade sendo os animais criados extensivamente em pastagem nativa melhorada. Os bovinos foram banhados três vezes ao ano e receberam uma aplicação de ivermectina, o que permite infestações baixas e constantes de carrapatos, ao longo dos anos.

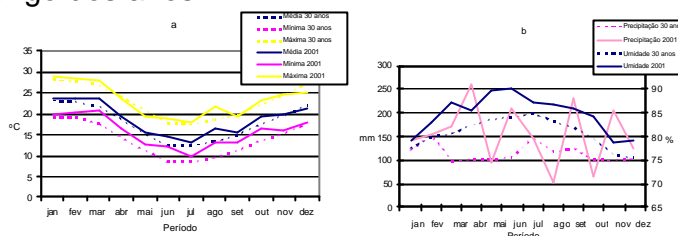


Figura 2 - Normais climatológicas de (a) temperaturas médias, mínimas, máximas, (b) umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica na região sul do Rio Grande do Sul no período de 1971 a 2000, comparadas com as médias mensais observadas em 2001.

Comparando os resultados destes mesmos animais em seu primeiro ano, analisado por Krolow (2002) dos sete até os 13 meses de idade, as titulações oscilaram entre 1:640 a 1:2560, porém dos 14 meses em diante observou-se uma diminuição significativa das titulações tanto para *B. bigemina* ($P < 0,0001$) como *B. bovis* ($P = 0,0002$) (Figuras 3 e 4). A análise de contrastes demonstrou que as titulações durante o primeiro ano de vida dos bovinos foram significativamente superiores quando comparadas ao segundo ano para *B. bovis* ($P = 0,0002$) e para *B. bigemina* ($P < 0,0001$). Pelo mesmo método observou-se que as titulações para *B. bigemina* mostraram diferenças significativas entre as estações do ano, sendo que as médias do verão foram superiores às das demais estações ($P < 0,05$) para esta espécie.

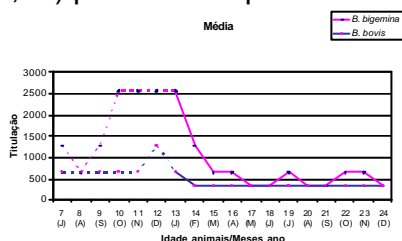


Figura 3 - Variações dos títulos de anticorpos anti-*B. bigemina* e *B. bovis* dos 7 aos 24 meses de idade, em bovinos naturalmente infectados (2000/2001).

Estas variações podem ser explicadas pela queda gradual dos níveis de anticorpos obtidos na primo-infecção (MELENDEZ & FORLANO, 1997; SOARES et al., 2000). No entanto, para *B. bovis* não houve esta diferença, talvez pela persistência maior dos anticorpos contra este protozoário. Já os anticorpos anti-*B. bigemina* não permanecem muito tempo circulantes no organismo hospedeiro, sendo que os bovinos necessitam novas inoculações pelos vetores para manter os níveis de anticorpos no organismo (MAHONEY et al., 1973).

As titulações de anticorpos anti-*B. bigemina* foram significativamente mais altas que as anti-*B. bovis* ao longo do experimento. Embora tenha ocorrido uma diminuição dos anticorpos para ambos os parasitos obtidos na primo-infecção, as titulações para *B. bigemina* permaneceram mais elevadas em relação a *B. bovis*, provavelmente devido a

B. bigemina ter como característica, além da transmissão alimentar, a transmissão vertical, ou seja, as teleóginas, independente de terem sido infectadas através do repasto sanguíneo, podem manter a infecção para próxima geração (MAHONEY e ROSS, 1972), representando um potencial reprodutivo superior (SMITH, 1982). Já com *B. bovis* a infecção da população de carrapatos é baseada somente na infecção alimentar da fêmea ingurgitada (FREIDHOFF e SMITH, 1981). Desta forma, provavelmente a *B. bigemina* esteja mais difundida no ambiente do que a *B. bovis* (OLIVÉ LEITE et al., 1989; ARTILES et al., 1995; ALMEIDA et al., 2006).

Ainda que a propriedade rural estudada neste trabalho tenha sido descrita como em situação de estabilidade (KROLOW, 2002), 13% dos animais apresentaram títulos baixos e inconstantes para *B. bovis* durante seu primeiro ano de vida e somente demonstraram presença estável de anticorpos durante o seu segundo ano, quando mantiveram um platô após a reinfestação por carrapatos. Este fato se observou no outono, onde normalmente ocorre a terceira geração do vetor (GONZALES, 2003). Estes resultados estão em concordância com Souza et al. (2002) e podem ser explicados pela maior oportunidade do contato dos bovinos com o carrapato. Estes mesmos animais, no seu primeiro ano de vida, foram infestados com *B. microplus*, conforme descrito em Krolow (2002) e houve soroconversão apenas para *B. bigemina*, concordando que este protozoário está mais difundido no ambiente, e considerando maior sua prevalência no sul do Rio Grande do Sul (OLIVÉ LEITE et al., 1989).

Almeida et al. (2006) observaram que os surtos de TPB ocorridos no sul do Rio Grande do Sul, no período de 1978 a 2005, foram na maior parte dos casos nos meses de verão e outono, e os animais afetados apresentavam de um a três anos de idade e destes, 41% foram causados por *B. bovis* e 4,9% por *B. bigemina*, o que reforça os dados verificados no presente estudo no qual os animais apresentam uma maior inoculação de *B. bigemina* e conseqüentemente uma imunização mais eficiente proporcionando raros casos clínicos por este patógeno. Em experimento no Uruguai, Solari et al. (1992) observaram que 90% dos surtos foram causados por *B. bovis* devido a estes protozoários estarem distribuídos de forma esparsa no país.

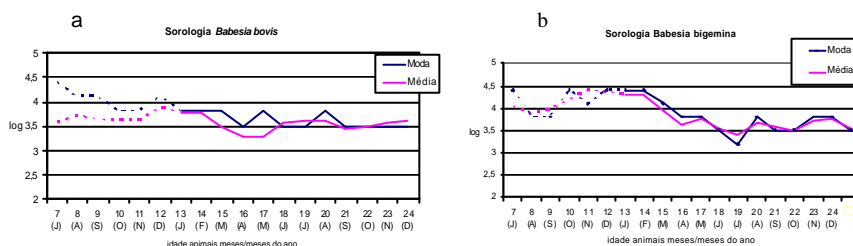


Figura 4 - Variações mensais dos títulos de anticorpos (após transformação logarítmica) anti-*B. bovis* (a) e anti-*B. bigemina* (b) em bovinos naturalmente infectados, na faixa etária de 7 aos 24.

CONCLUSÃO

A propriedade estudada encontra-se em situação de estabilidade enzoótica para babesiose bovina, mesmo estando localizada em área típica de instabilidade. As titulações de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* verificadas no segundo ano de vida dos bovinos são inferiores àquelas produzidas após a primo-infecção (durante o primeiro ano). Os animais sofrem maior inoculação de *B. bigemina*, uma vez que 100% mantiveram-se soropositivos durante todo o segundo ano de vida.

Mesmo diante da situação de estabilidade, alguns animais não apresentam níveis estáveis de anticorpos anti-*B. bovis* ao longo do seu segundo ano de vida, o que justifica ser essa espécie a maior causadora de surtos e casos clínicos isolados na região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.B.; TORTELLI, F.P.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J.L.M.; SOARES, M.P.; FARIAS, N.A.F.; 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.
- ARTILES, J., ALVES BRANCO, F.P., MARTINS, J.R., CORREA, L.B., SAPPER, M.F.M. Prevalência de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* no município de Bagé, RS. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.4, n.2, s.1, p. 179, 1995.
- FRIEDHOFF, K. T., SMITH, R.D. Transmission of *Babesia* by ticks. In: RISTIC, M., KREIER, J.P. **Babesiosis**. New York: Academic Press, Inc., 1981. Cap. 9, p. 267-321.
- GLORIA, M.A., DAEMON, E., FACCINI, J.L.H., GRISI, L. Influência de diferentes temperaturas sobre a biologia da fase não parasitária de *Boophilus microplus* (CAN., 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. V.2, nº 2, p. 85 -91, 1993.
- GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**. UPF editora, Universidade de Passo Fundo - RS, 128 p., 2003.
- IICA – INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACIÓN PARA LA AGRICULTURA. **Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina**. Costa Rica: IICA, 1984. (Serie Salud Animal, Publicación Científica nº8).
- KROLOW, R.C.P. **Imunidade passiva e ativa contra *Babesia bovis* (BABÈS, 1888) e *Babesia bigemina* (SMITH & KILBOURNE, 1893) em terneiros nascidos na primavera em área marginal para o vetor *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887)**. 2002. 75 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária – Sanidade Animal), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- MAHONEY, D. F.; ROSS, D.R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, p. 292-298, 1972.
- MAHONEY, D.F., WRIGHT, I.G, MIRRE, G.B. Bovine babesiosis: The persistence of immunity to *Babesia argentina* and *B. Bigemina* in calves (*Bos taurus*) after naturally acquired infection. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 67, p. 197 – 203, 1973.
- MAHONEY, D. F.; **Babesia of Domestic Animals**. New York, Academic Press, v. 4, p. 1-52, 1977.
- MARTINS, J.R. Tristeza parasitária bovina. In: Carrapatos: problemas e soluções. **Embrapa Gado de Leite**, Juiz de Fora, p. 39-49, 2005.
- MELENDEZ, R.D.; FORLANO, M. Seroprevalence and incidence of babesiosis and anaplasmosis in a Carora breed herd from Venezuela. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 105-109, 1997.
- OLIVÉ LEITE, A.M.; ARNONI, J.V.; SILVA, S.S.; FARIAS, N.A.; CRUZ, H.; NISHIKAWA, H. Serological study of bovine babesiosis in a marginal área of Brazil. In: NATIONAL VETERINARY HAEMOPARASITE DISEASES CONFERENCE, 8. St. Louis. **Proceedings...** April 10-12, p. 632-628, 1989.
- SACCO, A.M.S., Profilaxia da tristeza parasitária bovina: Por quê, quando e como fazer. **Circular Técnica, EMBRAPA – CPPSul**, Bagé, RS. ISSN 0100-8625, 2002.
- SAS. SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edition, vol 2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 1989.
- SMITH, R. Epidemiologia de la anaplasmosis y babesiosis bovina. **Salud Animal**, Publicación Científica 1, p. 267-278, 1982.
- SOARES, C.O., SOUZA, J.C.P., MADRUGA, C.R., MADUREIRA, R.C., MASSARD, C.L., FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesoregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 75-79, 2000.
- SOLARI, M.A.; NARI, A.; CARDOZO, H. Impact of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* on the production of beef cattle in uruguay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, suppl. III, p. 143-149, 1992.
- SOUZA, A.P.; SURKAMP, V.; BELLATO, V.; SARTOR, A.A.; FARIAS, L.M. Prevalência de anticorpos anti-*Babesia* em bovinos no planalto norte de Santa Catarina. **Revista de Ciência Agroveterinária**, v.1, n.1., p.21-23, 2002.