

DESENVOLVIMENTO DE CEPAS VIVAS ATENUADAS DE *BABESIA BOVIS* E *BABESIA BIGEMINA*: TESTE PRELIMINAR¹

RAUL HENRIQUE KESSLER², ANA MARIA S. SACCO³, ELANE F. DE JESUS⁴
e CLÁUDIO ROBERTO MADRUGA³

RESUMO - Foram efetivadas 16 passagens de *B. bovis* em bezerros esplenectomizados e quatro passagens de *B. bigemina* em bezerros intactos com o objetivo de desenvolver cepas atenuadas para posterior uso como vacina, de acordo com a tecnologia australiana. O teste preliminar da virulência e antigenicidade destas cepas, realizado a campo, em novilhos Hereford de dois anos de idade revelou que: 1) a cepa de *B. bovis* apresenta baixa virulência, uma vez que os animais inoculados não apresentaram sinais clínicos da doença durante a reação vacinal; 2) a cepa de *B. bigemina* apresenta ainda um grau elevado de virulência pois, dos cinco novilhos inoculados, três apresentaram sintomatologia clínica embora tenham se recuperado espontaneamente da infecção; 3) ambas as cepas apresentaram alta antigenicidade pois todos os animais inoculados apresentaram sorologicamente positivos ao teste de imunofluorescência indireta específico e resistiram ao desafio homólogo com as respectivas cepas virulentas, enquanto nos grupos testemunha, todos os novilhos sofreram a doença aguda e, apesar de devidamente medicadas, um morreu.

Termos para indexação: babesiose, vacina, atenuação, passagem bovina.

DEVELOPMENT OF LIVE ATTENUATED STRAINS OF *BABESIA BOVIS* AND *BABESIA BIGEMINA*: PRELIMINARY TEST

ABSTRACT - With the objective of developing local strains of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* attenuated according to the Australian method, sixteen rapid passages of *B. bovis* in splenectomized calves and four slow passages of *B. bigemina* in intact calves were made. A preliminary test of the virulence and antigenicity of these strains in two-year old Hereford steers in the field showed that: 1) the *B. bovis* strain was of low virulence as the inoculated animals did not present clinical signs of the disease during the vaccine reaction; 2) the *B. bigemina* strain was still too virulent since three of five inoculated steers presented visible clinical signs, although all recovered spontaneously from the infection; 3) both strains were highly antigenic as all inoculated animals were positive for the indirect fluorescent antibody test and resisted the homologous challenge with the respective virulent strain, while all of the non-vaccinated controls became acutely ill and although properly medicated, one died.

Index terms: Babesiosis, vaccine, attenuation, bovine passage.

INTRODUÇÃO

A babesiose tem sido um problema limitante da bovinicultura de corte e leite em países de clima tropical e subtropical como o Brasil.

Juntamente com o vetor, o carrapato *Boophilus microplus*, forma o complexo de maior importância econômica nestes países (McCosker 1981).

Enquanto alguns países evoluíram através da pesquisa de novos métodos de profilaxia (Mahoney

1977), no Brasil ainda persiste o primitivo método de premunicação (infecção x tratamento) cuja aplicabilidade em um sistema extensivo de criação e resultados são altamente questionáveis.

Neste trabalho apresentam-se os resultados de um teste preliminar a campo, de cepas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em fase de atenuação, segundo o método australiano (Callow & Mellors 1966).

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das cepas

As cepas GC 4974-83 de *B. bovis* e GC 5118-83 de *B. bigemina* foram isoladas no Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, em Campo Grande, MS, conforme descrito em Kessler et al. (1987).

¹ Aceito para publicação em 10 de fevereiro de 1987.

² Méd. - Vet., Ph.D., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), Caixa Postal 154, CEP 79100 Campo Grande, MS.

³ Méd. - Vet., M.Sc., EMBRAPA/CNPGC.

⁴ Méd. - Vet., Bolsista do CNPq.

Atenuação da cepa de *B. bovis*

O processo de atenuação de *B. bovis* foi baseado no método descrito por Callow & Mellors (1966). Resumidamente, foram efetuadas 16 passagens rápidas em bezerros esplenectomizados. Os bezerros foram observados, após a inoculação, quanto à temperatura, hematócrito e parasitemia. Na primeira e oitava passagens os bezerros foram inoculados com material conservado por congelamento em nitrogênio líquido. O inóculo variou de 10^7 a 10^{11} eritrócitos parasitados (EP) sendo que na maioria das passagens ficou entre 10^7 e 10^8 EP. O sangue parasitado relativo à 16ª passagem foi colhido em frasco estéril com pérolas de vidro, desfibrinado, filtrado em gase esterilizada, titulado, adicionado de polivinilpirrolidona (8%) e glicerol (12%), distribuído em ampolas de plástico em volumes de $\pm 1,3$ ml e congelado em nitrogênio líquido.

Atenuação de *B. bigemina*

Foram efetuadas quatro passagens lentas em bezerros intactos de acordo com o método de Callow (1978). O inóculo variou de $3,6 \times 10^6$ a $8,6 \times 10^8$ EP. O período entre passagens foi de três a sete meses, utilizando-se como inóculo o sangue parasitado da recidiva após esplenectomia. Na quarta passagem o inóculo estava preservado por congelamento. O sangue parasitado relativo à quarta passagem recebeu o mesmo tratamento descrito anteriormente para a cepa de *B. bovis*.

Teste das cepas

Para o teste preliminar da patogenicidade e imunogenicidade das cepas em estudo foram utilizados 20 novilhos Hereford (*Bos taurus*), de dois anos de idade, criados e mantidos a campo em uma fazenda situada em área livre de carrapatos, no município de Jaguarão, RS. Os novilhos foram negativos ao teste de imunofluorescência indireta (IFI) (Leefflang & Perié 1972), para *B. bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*.

Os animais foram divididos, ao acaso, em quatro grupos (A, B, C e D) de cinco novilhos cada. No dia 0, o grupo A foi inoculado por via subcutânea (s.c.) com $5,8 \times 10^7$ EP, oriundos da 16ª passagem da cepa de *B. bovis* GC 4974-83 e o grupo B com 10^8 EP oriundos da quarta passagem da cepa de *B. bigemina* GC 5118-83. Os grupos C e D permaneceram não inoculados, como testemunhas. Trinta dias após, os grupos A e C foram desafiados com 10^8 EP com a cepa GC 4974-83 virulenta original e os grupos B e D foram desafiados com 10^8 EP com a cepa GC 5118-83 virulenta, original. As cepas homólogas que serviram para o desafio, foram reativadas em bezerros esplenectomizados de modo a permitir um desafio com sangue fresco na fase ascendente da parasitemia.

Os animais permaneceram durante todo o experimento em regime de campo e foram observados quanto à temperatura, hematócrito, parasitemia, níveis de anticorpos específicos no soro e estado clínico geral. Os exames fo-

ram efetuados com intervalos de dois a três dias, sendo que no período de reação ao desafio com as cepas virulentas, foi procedido o exame diário. Com a mesma frequência foram colhidas amostras de soro para o acompanhamento da resposta imune, utilizando-se IFI.

RESULTADOS

Os dados relativos à temperatura máxima, parasitemia máxima e a máxima redução no hematócrito apresentado pelos bezerros esplenectomizados na seqüência de passagens rápidas da cepa de *B. bovis*, estão apresentados na Fig. 1. O período de incubação variou entre um e sete dias exceto na primeira e na nona passagens, quando os bezerros foram inoculados (s.c.) com material conservado por congelamento, que foi de 17 e dez dias, respectivamente. O sexto bezerro inoculado com $1,25 \times 10^8$ EP, apresentou sintomatologia de doença aguda, recuperando-se após medicação com babesicida. O sétimo e o oitavo bezerros, inoculados com $2,04 \times 10^{11}$ e $1,76 \times 10^{10}$ EP, respectivamente, morreram oito dias após a inoculação. O nono bezerro inoculado com 10^9 EP, s.c., recuperou-se após ser medicado com babesicida. Os demais bezerros inoculados com 10^7 e 10^8 EP, recuperaram-se sem o auxílio de medicação.

Os dados relativos às variações de temperatura, hematócrito e percentagem de parasitemia apresentadas pelos bezerros na seqüência de passagens lentas de *B. bigemina*, estão apresentados na Fig. 2. O período de incubação do primeiro bezerro inoculado através de ninfas, foi de dez dias. Na segunda passagem, o bezerro inoculado por via intravenosa (i.v.) com $3,6 \times 10^6$ EP, apresentou um período de incubação de dois dias. Na terceira passagem, para um inóculo (i.v.) de $8,6 \times 10^8$ EP, o período de incubação foi, também, de dois dias. Na quarta passagem, quando o bezerro foi inoculado (s.c.) com $5,35 \times 10^8$ EP do material preservado por congelamento, o período de incubação foi de sete dias. Todos os animais recuperaram-se da infecção sem o auxílio de medicação. Com exceção do primeiro bezerro, que foi inoculado através das ninfas, que apresentou elevada parasitemia (19,5%) e grande redução do hematócrito (80%), os demais apresentaram infecção subclínica.

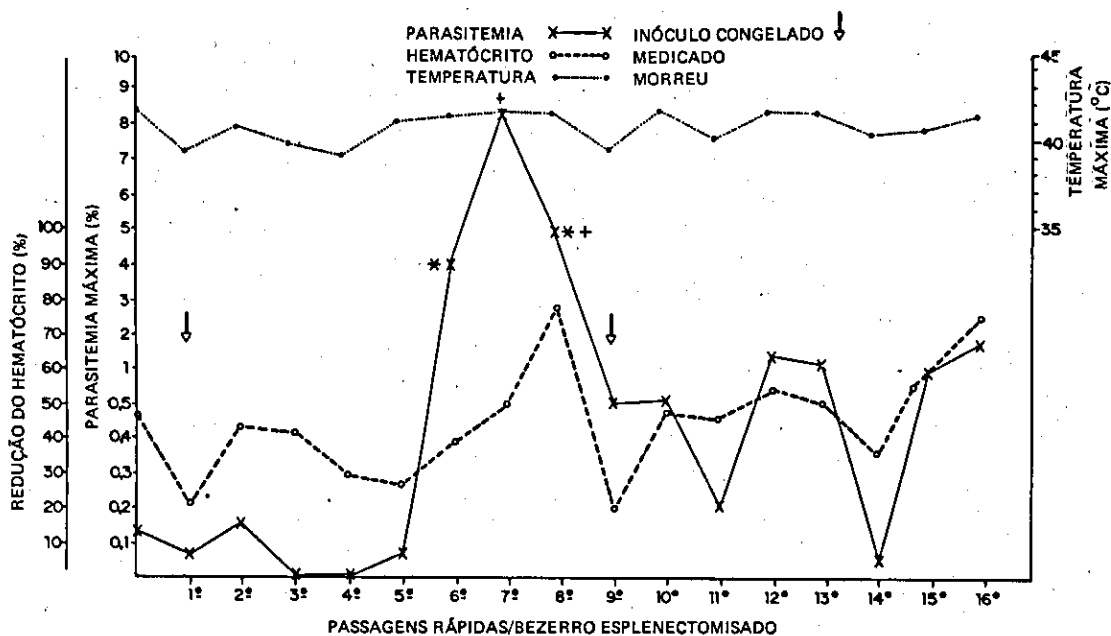


FIG. 1. Variações de parasitemia máxima, redução do hematócrito e temperatura máxima, apresentadas por bezerros esplenectomizados submetidos a passagens rápidas de *Babesia bovis*.

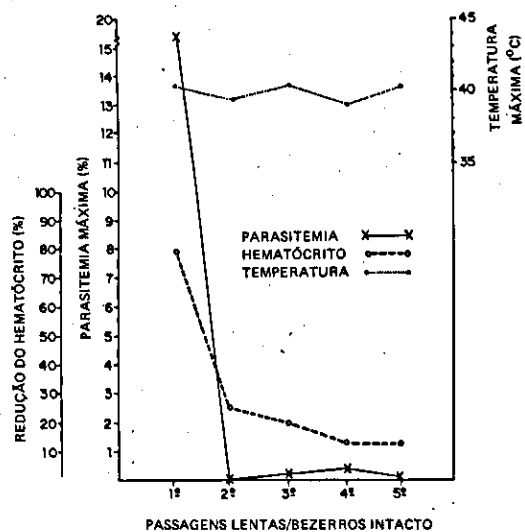


FIG. 2. Variações de parasitemia máxima, redução do hematócrito e temperatura máxima, apresentadas por bezerros intactos submetidos a passagens lentas de *Babesia bigemina*.

Os resultados dos testes vacinais de campo das cepas de *B. bovis* e *B. bigemina* estão transcritos nas Tabelas 1 e 2.

A temperatura média e o hematócrito normal para o grupo A foram de 40,2°C e 33,4%. Após a inoculação com a cepa teste e desafio com a cepa homóloga virulenta de *B. bovis*, as médias das temperaturas máximas foram de 41°C e 41,9°C, respectivamente, o que representa uma variação de 0,77°C na reação vacinal e 1,57°C na reação ao desafio com a cepa virulenta. Quanto ao hematócrito mínimo, as médias foram de 27,8% para a reação vacinal e 25,6% para a reação frente à cepa virulenta, o que representa uma redução média do hematócrito de 16,8% e 23,35%, respectivamente. As parasitemias médias para estas duas fases do experimento foram de < 0,01% e 0,017%, e os períodos de incubação de 13,5 e 10,2 dias, respectivamente. Estes animais não apresentaram sintomatologia clínica durante todo o período experimental. O grupo C, não inoculado com a cepa-teste

te e desafiado com a cepa virulenta de *B. bovis* tinha como temperatura e hematócrito médios normais 40,1°C e 31,6% respectivamente. Após o desafio, a média das temperaturas máximas foi de 42,1°C, o que representa uma variação de 2,0°C. A média dos hematócritos mínimos observados foi de 15,2%, representando uma redução de 52%. A média das parasitemias máximas observadas foi de 1,9% e o período de incubação médio foi de seis dias. O grupo B, inoculado com a cepa teste de *B. bigemina* apresentou uma temperatura média inicial de 40,2°C e um hematócrito médio de 31,8%.

Durante os períodos de reação à cepa-teste e ao desafio homólogo, a média das temperaturas máximas foi de 40,6°C e 41,5°C, o que representa um aumento de 0,4°C e 1,3°C, respectivamente. Quanto ao hematócrito mínimo, as médias foram 16,6% durante a reação vacinal e 22,2% na reação ao desafio com a cepa virulenta, correspondendo a decréscimos de hematócrito de 44,65% e 30,19% respectivamente.

A média das parasitemias máximas atingidas foram de 1,09% e 0,7%, respectivamente e dos períodos de incubação nove e 4,8 dias. Três animais deste grupo apresentaram sintomas clínicos de

TABELA 1. Variação da temperatura, hematócrito e parasitemia dos novilhos do grupo A, vacinado com a cepa teste de *B. bovis* e desafiado com a cepa homóloga virulenta, e do grupo C, testemunha não vacinado e desafiado com a cepa virulenta.

Animal número	Temperatura normal (°C) *	Temperatura máxima		Hematócrito normal (%) *	Hematócrito mínimo		Parasitemia máxima		Período de incubação	
		Vacinal	Desafio		Vacinal	Desafio	Vacinal	Desafio	Vacinal	Desafio
Grupo A										
656	39,9	41,6	41,6	33	25	24	< 0,01	0,06	11	12
657	39,7	40,7	41,9	33	26	25	< 0,01	< 0,01	11	10
658	40,7	40,9	42,0	35	32	29	< 0,01	< 0,01	16	12
659	40,4	40,9	42,0	31	28	22	neg	0,01	-	10
660	40,5	40,9	41,8	35	30	28	< 0,01	< 0,01	16	7
\bar{x}	40,2	41,0	41,9	33,4	27,8 ^a	25,6 ^b	< 0,01 ^a	0,017 ^b	13,5 ^b	10,2 ^a
Grupo C										
666	40,0		41,9	33		19		0,8		9
667	39,7		42,0	31		15		1,4		5
668	39,7		42,1	30		11		0,9		6
669	40,5		42,2	30		10		5,4		5
670	40,5		42,5	34		21		0,9		5
\bar{x}	40,1		42,1	31,6		15,2 ^b		1,9 ^b		6 ^b

* Média de três tomadas.

Valores com letras diferentes são significativamente diferentes.

TABELA 2. Variação da temperatura, hematócrito e parasitemia dos novilhos do grupo B, vacinado com a cepa teste de *B. bigemina* e desafiado com a cepa homóloga virulenta, e do grupo D, testemunha não vacinado e desafiado com a cepa virulenta.

Animal número	Temperatura normal (°C) *	Temperatura máxima		Hematócrito normal (%) *	Hematócrito mínimo		Parasitemia máxima		Período de incubação	
		Vacinal	Desafio		Vacinal	Desafio	Vacinal	Desafio	Vacinal	Desafio
Grupo B										
661	40,1	40,8	41,4	30	8	19	0,82	0,5	7	4
662	40,5	40,3	41,8	32	31	22	0,01	0,9	17	4
663	40,2	40,3	41,2	33	8	20	1,3	0,8	7	4
664	40,1	40,8	41,3	33	13	25	2,7	0,9	7	6
665	40,3	40,8	41,6	31	23	25	0,64	0,4	7	6
\bar{x}	40,2	40,6	41,5	31,8	16,6 ^a	22,2 ^b	1,09 ^a	0,7 ^a	9,0 ^a	4,8 ^b
Grupo D										
671	39,5		40,8	32		17		3,9		4
672	40,7		41,8	31		17		3,5		4
673	39,4		41,6	32		8		8,0		4
674	40,4		41,5	32		23		3,0		4
675	40,1		42,3	30		22		2,9		4
\bar{x}	40,0		41,6	31,4		17,4 ^a		4,26 ^b		4 ^b

* Média de três tomadas.

Valores com letras diferentes são significativamente diferentes.

doença, porém recuperaram-se sem auxílio de medicação. O grupo D, não inoculado com a cepa-teste e desafiado com a cepa homóloga virulenta de *B. bigemina*, apresentou uma temperatura média inicial de 40,0°C e um hematócrito médio de 31,4%. Após o desafio, a média das temperaturas máximas foi de 41,6°C, dos hematócritos mínimos de 17,4%, o que corresponde a um aumento de 1,6°C na temperatura e um decréscimo de 44,6% no hematócrito. A média das parasitemias máximas observadas foi 4,26% e dos períodos de incubação de quatro dias.

Todos os animais dos grupos C e D, controles não inoculados com as cepas-teste e desafiados com as respectivas cepas virulentas, apresentaram sintomatologia da doença aguda tendo sido medicados com babesicida para evitar perdas desnecessárias. Um dos animais do grupo C desafiado com *B. bovis* virulenta morreu apesar de ter sido medicado e de ter recebido transfusão de sangue.

A análise estatística, visando o teste de Mann-Whitney (Siegel 1975) para pequenas amostras (< 8) dos dados demonstrou que: 1) houve diferença significativa ($P < 0,004$) para decréscimo de hematócrito, parasitemia máxima e período de incubação entre o grupo A na fase de reação vacinal com a cepa teste de *B. bovis* e o grupo C não vacinado e desafiado com a cepa homóloga virulenta; 2) houve diferença significativa ($< 0,004$) para decréscimo de hematócrito e parasitemia máxima e $P < 0,008$ para período de incubação entre o grupo A na fase de desafio com a cepa homóloga virulenta e o grupo C; 3) não houve diferença significativa ($P > 0,016$) para decréscimo de hematócrito entre o grupo B na fase de reação vacinal com a cepa teste de *B. bigemina* e o grupo D não vacinado e desafiado com a cepa homóloga virulenta; 4) houve diferença significativa ($P < 0,004$) para parasitemia máxima e período de incubação entre o grupo B na fase de reação vacinal e o grupo D; 5) houve diferenças significativas para o decréscimo de hematócrito ($P < 0,016$) e para parasitemia ($P < 0,004$) entre o grupo B na fase de desafio com a cepa homóloga e o grupo D; 6) não houve diferença ($P > 0,016$) para período de incubação entre o grupo B, na fase de desafio e o grupo D.

As variações de temperatura, hematócrito e parasitemia observadas no transcurso das passagens sucessivas da cepa de *B. bovis*, por si só não foram suficientes para demonstrar uma modificação no agente que sugerisse sua atenuação. Embora os bezerros inoculados a partir da décima passagem terem se recuperado espontaneamente da infecção, houve um decréscimo marcante do hematócrito na décima quinta e décima sexta passagens. Entretanto, o aumento da percentagem de parasitemia no sangue periférico com a diminuição dos sinais clínicos era esperado como indicador de modificação na cepa.

No teste a campo a cepa apresentou baixa virulência, uma vez que os bovinos inoculados não apresentaram sintomatologia clínica durante o período de reação, e alta antigenicidade, pois os animais vacinados resistiram ao desafio com a cepa homóloga virulenta sem apresentarem sintomas de doença, enquanto que no grupo testemunha todos os animais sofreram a doença aguda, sendo que um deles morreu, apesar de ter sido devidamente medicado.

A medicação dos animais do grupo controle prejudicou em parte a apreciação dos dados extremos, entretanto, como a patogenia destes parasitos é bastante conhecida e é esperada uma mortalidade superior a 90% em bovinos desta categoria, quando não medicados, optou-se por esta prática para evitar perdas desnecessárias de animais. Os dados colhidos até a data da medicação, contudo, foram suficientes para demonstrar diferença estatística significativa entre os tratamentos.

Quanto à cepa de *B. bigemina*, o acompanhamento dos animais experimentais, durante a fase de passagens lentas, sugeriu uma atenuação do agente a partir da segunda passagem em virtude da diminuição progressiva do decréscimo do hematócrito. Entretanto, o comportamento dos animais a campo não confirmaram os resultados esperados.

Apesar de todos os animais inoculados com a cepa teste terem se recuperado espontaneamente da infecção, três deles apresentaram sintomatologia clínica, o que indica que a cepa ainda apresenta um grau muito elevado de virulência. Callow

(1978) recomenda passagens em bezerros intactos, com intervalos de um a dois meses. Neste trabalho, as passagens foram feitas com intervalos de três a sete meses, porém, utilizando-se como inóculo o material colhido na recidiva, após a esplenectomia. Talvez esta diferença na metodologia seja responsável pela divergência dos resultados.

CONCLUSÕES

1. O método utilizado para a atenuação de *B. bovis* resultou em um agente de baixa virulência e alta antigenicidade frente ao desafio com cepa homóloga virulenta. Deverão ser efetuados testes frente a cepas heterólogas e transmitidas pelo carrapato.

2. O método utilizado para a atenuação de *B. bigemina* não apresentou resultados totalmente satisfatórios, devendo ser feitas mais passagens e modificações na metodologia.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Michael Robin Honer, pela análise estatística dos dados, e ao pecuarista Sr. José da Costa Ferreira Filho, pela

inestimável colaboração, colocando seu estabelecimento pastoril à disposição para execução do teste de campo. Agradecemos também a todos que colaboraram de alguma forma, tornando possível a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- CALLOW, L.L. Vaccination against bovine babesiosis. s.l., Queensland Department of Primary Industries, 1978. 48p.
- CALLOW, L.L. & MELLORS, L.T. A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomized calves. *Aust. Vet. J.*, 42:464-5, 1966.
- KESSLER, R.H.; MADRUGA, C.R.; JESUS, E.F. de; SEMPREBOM, D.V. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. *Pesq. agropec. bras.*, 22(7): 747-52, 1987.
- LEEFLANG, P. & PERIÉ, N.N. Comparative immunofluorescent studies on 4 *Babesia* species of cattle. *Res. Vet. Sci.*, 13:342-6, 1972.
- MACCOSKER, P.J. The global importance of Babesiosis. In: RISTIC, M. & KREIER, J.P., ed. *Babesiosis*. New York, Academic, 1981. p.1-24.
- MAHONEY, D.F. *Babesia* of domestic animals. In: KREIER, J.P., ed. *Parasitic protozoa*. New York, Academic, 1977. v.4., p.1-52.
- SIEGEL, S. *Estatística não paramétrica*. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1975. p.131.