

DESENVOLVIMENTO DE CEPAS ATENUADAS DE *BABESIA BOVIS*, *BABESIA BIGEMINA* E *ANAPLASMA CENTRALE*: III. TESTE CRÍTICO COM BOVINOS BRANGUS

M. A. M. SCHENK¹, R. H. KESSLER¹, M. MIGUITA² & M. R. HONER¹

(1) Pesquisadores; (2) Técnica Especializada, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (EMBRAPA-CNPIC) Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS.

SUMÁRIO: Foram vacinados 95 bovinos Brangus (machos e fêmeas, com 8 a 12 meses de idade) com cepas atenuadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma centrale*, com o objetivo de observar a inocuidade e a infectividade e determinar a taxa de proteção frente ao desafio pelo carrapato no campo. Os animais foram distribuídos aleatoriamente, nos grupos A, B, C (n=10 por grupo), E (n=65). O grupo D (n=7) foi mantido como controle da reação vacinal, não recebendo vacina. Os animais do grupo A foram vacinados com *B. bovis* e *A. centrale* e 30 dias após foram vacinados com *B. bigemina*; os do grupo B com *B. bigemina* e *A. centrale* e 30 dias após com *B. bovis*; os do grupo C e os do grupo E com as três cepas simultaneamente e, os do grupo D permaneceram não vacinados como controle da reação vacinal. Sessenta dias após a vacinação, os animais foram expostos ao desafio pelo carrapato no campo. Os animais dos grupos A, B, C e D foram monitorados clínica e laboratorialmente três vezes por semana, enquanto os do grupo E somente quando apresentaram sinais clínicos da doença. Na fase vacinal houve somente um caso clínico de babesiose (grupo A), manifestado por elevação da temperatura, decréscimo acentuado do hematócrito e uma parasitemia de 4,2% por *B. bigemina*. Na fase de desafio ocorreram dois casos clínicos por *B. bovis* (B e C), um por *B. bigemina* (C) e três por *A. marginale* (A, B e C). Todos se recuperaram, com exceção de um animal que morreu (A), tendo sido detectada neste elevada parasitemia por *A. marginale* (24%). Os 65 animais do grupo E não apresentaram doença clínica na fase vacinal. Entretanto, no desafio, um animal apresentou babesiose, por *B. bigemina* e dois de anaplasmoses por *A. marginale*, os quais se recuperaram após medicação específica. Considerando todos os animais vacinados, a taxa de inocuidade da cepa de *B. bigemina* foi de 99% e as de *B. bovis* e *A. centrale* 100%. A taxa de proteção foi de 98% para *B. bovis* e *B. bigemina* e 95% para *A. marginale*.

PALAVRAS CHAVE: Bovinos, cepas atenuadas, vacina, babesiose e anaplasmoses.

INTRODUÇÃO

A babesiose e a anaplasmoses são hemoparasitoses de distribuição mundial. Estas doenças, popularmente conhecidas como tristeza parasitária bovina (TPB), são responsáveis por grandes prejuízos à bovinocultura (KUTTLER, 1988).

O principal vetor da TPB, o carrapato *Boophilus microplus*, segundo HONER (1989), tem condições de se desenvolver em quase todo o território brasileiro. Quando há exposição precoce de bezerros aos agentes da TPB, os efeitos da doença são minimizados. Entretanto, em áreas onde as condições ecológicas são desfavoráveis para o *B. microplus*, ou quando da importação de bovinos de áreas livres de carrapato, a doença ocorre sob forma aguda, acarretando alta mortalidade,

havendo a necessidade de um processo de imunização (LIMA, 1991).

Na Austrália foi desenvolvido um método eficiente de imunização utilizando cepas vivas e atenuadas de *Babesia bovis* (CALLOW & MELLORS, 1966) e *Babesia bigemina* (CALLOW, 1977; DALGLIESH *et alii*, 1981). Esta tecnologia foi reproduzida em diversos países, sendo que, no Brasil, KESSLER *et alii* (1987a e 1987b) isolaram e atenuaram cepas de *B. bovis* e *B. bigemina*, realizando testes de laboratório e campo.

Uma cepa de *Anaplasma centrale*, isolada na África do Sul, com característica de baixa patogenicidade e induzindo uma razoável imunidade cruzada com o *Anaplasma marginale*, também, tem sido utilizada como vacina (NARI *et alii*, 1979; PIPANO, 1985; PALMER, 1989; PAYNE *et alii*, 1990).

O objetivo deste trabalho foi observar as reações vacinais (inocuidade e infectividade) de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. centrale* e determinar a taxa de proteção destas cepas, frente ao desafio pelo carrapato, no campo, em bovinos da raça Brangus.

MATERIAL E MÉTODOS

Área experimental: O trabalho foi realizado em uma fazenda situada na microrregião de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, localizada entre as latitudes 20 e 21S, com clima do subtipo Aw (clima tropical de savana) segundo a classificação de Köppen (OMETTO, 1981).

Origem das cepas: Para imunização contra a babesiose foram utilizadas as cepas GC 4974/83, lote 8679 (17^a passagem) de *B. bovis* e GC 5118/83, lote 8869 (6^a passagem) de *B. bigemina*. As cepas foram isoladas, atenuadas e preservadas de acordo com KESSLER et alii (1987a e 1987b). Para a imunização contra a anaplasmose, foi utilizado o lote 8860 da cepa de *A. centrale* procedente do DILAVE Miguel C. Rubino, Uruguai.

Inóculos: Os inóculos vacinais foram: 2×10^7 eritrócitos parasitados (EP) para *B. bovis*; $2,5 \times 10^6$ EP para *B. bigemina* e 5×10^6 para *A. centrale*. Após o descongelamento em banho-maria (37°C), as vacinas foram diluídas a 1:4 em solução salina glicosada e glicerinada, sendo inoculadas no volume de 2 ml por via subcutânea.

Animais experimentais: Foram utilizados bovinos (machos e fêmeas) da raça Brangus, com idades de 8 a 12 meses, importados de região livre do carrapato *B. microplus* (EUA), sorologicamente negativos ao teste de imunofluorescência indireta (IFI) para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale*. Trinta e sete animais foram mantidos em baias (fase vacinal) e os restantes permaneceram a campo, em pastagem de *Brachiaria decumbens*, previamente vedada por, aproximadamente, 60 dias. Estes animais foram mantidos livres de infestação pelo carrapato aplicando-se quinzenalmente carrapaticida piretróide (Flumethrin, Bayticol "pour on" Bayer do Brasil S.A.).

Delineamento experimental: Trinta e sete animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos A, B, C e D, com os seguintes tratamentos: Grupo A (n=10): vacinados com *B. bovis* e *A. centrale* e, trinta dias após, com *B. bigemina*; Grupo B (n=10): vacinados com *B. bigemina* e *A. centrale* e, trinta dias após, com *B. bovis*; Grupo C (n=10): vacinado simultaneamente com as três cepas e Grupo D (n=7): não vacinado, controle da reação vacinal. Os 65 bovinos restantes, constituindo o grupo E, foram vacinados com as três cepas, simultaneamente, permanecendo no campo sob observação, sendo examinados somente quando apresentaram sinais clínicos. Sessenta dias após a vacinação, os animais foram expostos ao desafio pelo carrapato, no campo. Considerando-se o alto valor dos animais e seu padrão zootécnico, decidiu-se não desfiar o grupo D (controle da reação vacinal, não vacinado), em virtude da virulência

Tabela 1 - Média da variação da temperatura retal [vT], hematócrito mínimo absoluto e redução [HtM e HtR], percentagem de parasitemia [PP] e soroconversão pela IFI em três grupos [A, B e C] de bovinos da raça Brangus, vacinados com cepas atenuadas de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma centrale* - fase vacinal, e o grupo controle, D.

Parâmetro	GRUPO							
vacinal	A		B		C		D	
N	10		10		10		7	
P	B.bo	B.bi+A.ce	B.bi	B.bo+A.ce	B.bo+B.bi	A.ce	-	-
vT	1,0	1,1	0,9	1,0	0,6	0,8	1,0	1,1
HtM	29,1	20,4	30,7	24,5	30,8	24,4	29,7	29,1
HtR	10,9	37,4	10,5	30,0	10,0	29,0	11,9	15,0
PP	<0,01	0,5;2,2	0,05	<0,01;2,6	0,0/<0,01	2,3	0,0	0,0
IFI	7/10	10/10;10/10	10/10	6/10;10/10	7/10;10/10	10/10	0/7	0/7

N = número de animais no grupo; P = B.bo = *Babesia bovis*; B.bi = *B. bigemina*; A.ce = *Anaplasma centrale*.

Tabela 2 - Média da variação da temperatura retal [vT], hematócrito mínimo absoluto e redução [HtM e HtR], percentagem de parasitemia [PP] e soroconversão IFI em três grupos [A, B e C] de bovinos da raça Brangus, vacinados com cepas atenuadas de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma centrale* - fase desafio.

Parâmetro	GRUPO					
desafio	A		B		C	
N	10		10		10	
P	B.bo+B.bi	A.ma	B.bo+B.bi	A.ma	B.bo+B.bi	A.ma
vT	1,1	0,6	1,5	0,6	1,1	0,4
HtM	21,6	21,8	21,8	24,3	21,5	23,0
HtR	33,4	33,4	36,9	28,7	37,2	33,0
PP	<0,01;0,7	5,3	<0,01;0,3	1,2	<0,01;0,8	2,8
IFI	10/10;10/10	10/10	10/10;10/10	10/10	10/10;10/10	10/10

N = número de animais no grupo; B.bo = *Babesia bovis*; B.bi = *B. bigemina*; A.ma = *Anaplasma marginale*.

dos organismos de campo já comprovada em experimentos anteriores. Durante a fase vacinal e de desafio os animais dos quatro grupos experimentais foram examinados, três vezes por semana, quanto à temperatura retal, hematócrito, percentagem de parasitemia e estado clínico geral. Uma vez por semana foi colhido sangue para determinação de anticorpos específicos no soro, pelo teste de IFI. A análise estatística dos resultados foi feita pelo teste "t" de Student, ao nível de P = 0,05.

RESULTADOS

Os resultados referentes às médias das variações das temperaturas retais, dos hematócritos, das percentagens de parasitemia e a soroconversão pelo teste de IFI, por grupo vacinado, durante as fases vacinal e de desafio, encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

Durante a fase vacinal, houve somente um caso clínico de babesiose no grupo A, manifestado por elevação de temperatura (1,5 °C), redução acentuada do hematócrito (70,5%) e parasitemia máxima de 4,2%, por *B. bigemina*. Após a medicação específica, o animal recuperou as condições normais. Entre os demais, nove apresentaram parasitemia nos esfregaços de sangue periférico, com percentagens entre <0,01 e 0,6% por *B. bigemina*, enquanto que três apresentaram parasitemia <0,01 por *B. bovis*. As temperaturas médias dos diversos grupos, no início do experimento (dia 0), não diferiram estatisticamente (P>0,05) entre si, mas todas diferiram (P<0,05) das médias da variação da temperatura retal (vT) durante a fase vacinal (Tabela 1). As

reduções dos hematócritos, nos animais dos grupos A, B e C, na fase de reação vacinal às espécies de *Babesia* não diferiram significativamente entre si ou em relação ao grupo D (controle) ($P>0,05$). Na reação vacinal ao *A. centrale* (grupo C) ou quando as reações às babesias coincidiram com a reação ao *A. centrale* (grupos A e B) as reduções de hematócrito foram significativas ($P<0,05$) (Tabela 1). Quanto à soroconversão, pode-se observar na Tabela 1 que 7/10 animais foram positivos no teste de IFI, nos grupos A e C e 6/10 no grupo B, para *B. bovis*. Durante a fase do desafio pelo carrapato no campo, ocorreram dois casos clínicos por *B. bovis* (grupos B e C), um por *B. bigemina* (grupo C) e três por *A. marginale* (grupos A, B e C). Após a medicação específica, os animais se recuperaram, com exceção de um animal do grupo A que morreu, tendo sido detectada uma elevada parasitemia por *A. marginale* (24%) e uma acentuada redução do hematócrito (75,7%). Entretanto, a análise estatística revelou que não houve diferença significativa ($P>0,05$) nas variações de temperatura e hematócrito entre os grupos A, B e C. Todos os animais dos grupos A, B e C, apresentaram parasitemia por *B. bovis* e *B. bigemina*, com exceção do grupo C, em que somente sete animais apresentaram parasitemia por *B. bovis*. A presença de *A. marginale* foi detectada em cinco, dois e três animais dos grupos A, B e C, respectivamente. Todos os animais apresentaram soroconversão para as três espécies. Os 65 animais do grupo E, não apresentaram doença clínica, durante a fase de reação vacinal. Entretanto, durante a fase do desafio, um animal apresentou sinais clínicos de babesiose por *B. bigemina* e dois, de anaplasmoses por *A. marginale*, os quais se recuperaram após medicação específica.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As cepas vacinais apresentaram baixa virulência. Na fase de reação às babesias, as variações do hematócrito não diferiram entre os tratamentos ($P>0,05$). O único parâmetro que foi significativamente diferente ($P<0,05$) foi o aumento de temperatura retal. Quando houve coincidência das reações vacinais das babesias com o *A. centrale*, as variações de ambos os parâmetros (temperatura e hematócrito) foram significativamente diferentes do grupo controle ($P<0,05$). Entretanto, neste caso, apenas um animal apresentou doença clínica por *B. bigemina* na fase em que houve coincidência das reações vacinais com o *A. centrale*. Isto significa, considerando-se todos os animais vacinados, que a taxa de inocuidade da cepa de *B. bigemina* foi de 99%, enquanto que a das cepas de *B. bovis* e *A. centrale* foi de 100%. Estes resultados estão de acordo com os anteriormente encontrados, quando foram vacinadas novilhas da raça Holandesa (KESSLER, 1993 (EMBRAPA-CNPGC), Comunicação pessoal), e diferem dos resultados obtidos por PAYNE *et alii* (1990) que, trabalhando com bovinos adultos, da raça Holandesa, tiveram que medicar, durante a reação vacinal 18 bovinos para *Babesia* e 13 para *Anaplasma*, o que

representou taxas de inocuidade de 82% e 87% respectivamente. Esta diferença pode ser atribuída à idade dos animais vacinados, uma vez que os animais jovens são mais resistentes do que os adultos (McCOSKER, 1981).

Aparentemente, a vacinação prévia dos animais contra *B. bovis* não influenciou na reação posterior à infecção por *B. bigemina* (grupo A), nem a vacinação prévia com *B. bigemina* influenciou na reação posterior à infecção por *B. bovis* (grupo B). As reações às infecções simples (grupos A e B) não diferiram das reações às infecções concomitantes (grupo C). Conclui-se, portanto, que as vacinas de *Babesia* spp. podem ser aplicadas simultaneamente. Apesar de as reações terem sido de caráter subclínico, em sua maioria, é recomendável evitar a coincidência das reações às *Babesia* spp. com as do *Anaplasma* spp. Entretanto, como os períodos de incubação são diferentes, as três vacinas podem ser aplicadas simultaneamente.

As taxas de proteção foram: para a *B. bovis*, 90% nos grupos B e C e 100% nos grupos A e E; para a *B. bigemina*, 90% no grupo C, 98% no grupo E e 100% nos grupos A e B; para o *A. centrale*, 90% nos grupos A, B e C e 97% no grupo E. Considerando-se todos os animais vacinados ($n=95$) com cada uma das cepas, as taxas de proteção foram de 98% para *B. bovis* e *B. bigemina* e, 95% para o *A. centrale*. Admitindo-se a soroconversão como indicativo da infecção, as taxas de infectividade foram: para *B. bovis*, 70% nos grupos A e C e 60% no grupo B e, para *B. bigemina* e *A. centrale*, 100% em todos os grupos. Estas baixas taxas de infectividade da cepa de *B. bovis* não estão de acordo com a taxa de proteção frente ao desafio através do carrapato no campo. Isto sugere que, apesar de negativos no teste, os animais foram estimulados imunologicamente pela infecção primária, respondendo melhor à infecção secundária com os organismos virulentos, apresentando 100% de soroconversão após o desafio. Resultados semelhantes foram obtidos em trabalho anterior (KESSLER, 1993 (EMBRAPA-CNPGC) Comunicação pessoal). JORGENSEN *et alii* (1989) obtiveram 97% de infectividade para uma cepa de *B. bovis* e 100% para as cepas de *B. bigemina* e *A. centrale*, conservadas por congelamento em nitrogênio líquido. Entretanto, este trabalho não apresenta resultados de desafio. PAYNE *et alii* (1990), trabalhando com vacinas refrigeradas, obtiveram 100% de soroconversão após a reação vacinal. Entretanto, as taxas de proteção foram de 90% para a *B. bigemina* e 55% para o *A. centrale*. Conforme os próprios autores ressaltam, todos os animais que foram medicados durante a reação vacinal, apresentaram doença clínica no desafio. Estes resultados sugerem que a medicação no início da reação vacinal interfere no desenvolvimento da imunidade protetora.

SUMMARY

Attenuated strains of *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma centrale* were used to vaccinate 95 Brangus cattle

(males and females, 8 to 12 months old), to study strain inocuity and infectivity, and to determine the level of protection, when challenged with ticks on pasture. Animals were allocated at random to groups A, B and C (n = 10 per group), E (n = 65) and D (n = 7), maintained as a control group and were not vaccinated. Animals in group A were vaccinated with *B. bovis* and *A. centrale* and 30 days later, with *B. bigemina*. Group B were vaccinated with *B. bigemina* and *A. centrale* and 30 days later, with *B. bovis*. Group C and the animals in group E were vaccinated with the three strains simultaneously and group D remained non-vaccinated as control of the vaccine reaction. Sixty days after vaccination, the animals were exposed to pasture tick challenge. Animals in groups A, B, C and D were accompanied with clinical and laboratory tests three times a week, but those of group E only when showing clinical symptoms. During the vaccination phase, there was only one clinical case of babesiosis (group A) characterized by a rise in temperature, a marked fall in haematocrit and a parasitaemia of 4.2% by *B. bigemina*. During the challenge phase there were two clinical cases of *B. bovis* (B and C), one case of *B. bigemina* (C) and three of *A. marginale* (A, B, C). All animals recovered with one exception (A), an animal which died with a high parasitaemia of *A. marginale* (24%). The 65 animals in group E showed no clinical signs during the vaccination phase. During challenge, however, one animal showed babesiosis by *B. bigemina* and two showed anaplasmosis by *A. marginale*. These animals recovered after specific medication. Considering all the animals vaccinated, the inocuity rates per strain were 99% for *B. bigemina* and 100% for *B. bovis* and *A. centrale*. The rate of protection was 98% for *B. bovis* and *B. bigemina* and 95% for *A. marginale*.

KEY WORDS: Bovines, babesiosis, anaplasmosis, attenuated strains, vaccine.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Francisco de Assis Borges e ao Sr. Fernando F. Garcia pelo apoio no manejo dos animais experimentais e ao Dr. Cláudio Roberto Madruga pela criteriosa revisão do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- CALLOW, L. L. (1977) Vaccination against bovine babesiosis. In: *Immunity to blood parasites of animals and man*, MILLER, L. H.; PINO, J. A. & McKELVEY Jr., J. (eds.) Plenum Press, New York, p.121-49.
- CALLOW, L. L. & MELLORS, L. T. (1966) A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomised calves. *Australian Veterinary Journal*, 42: 464-5.
- DALGLIESH, R. J.; CALLOW, L. L.; MELLORS, L. T. & MCGREGOR, W. (1981) Development of a highly infective *Babesia bigemina* vaccine of reduced virulence. *Australian Veterinary Journal*, 57: 8-11.
- HONER, M. R. (1989). Epidemiologia da tristeza parasitária bovina. In: *Curso de Parasitologia Animal*, 2., Bagé, 1988. *Anais*. Bagé, p.129-38.
- JORGENSEN, W. K.; DE VOS, A. J. & DALGLIESH, R. J. (1989) Infectivity of cryopreserved *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma centrale* for cattle after thawing, dilution and incubation at 30°C. *Veterinary Parasitology*, 31: 243-51.
- KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R.; JESUS, E. F. de & SEMPREBON, D. V. (1987a) Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em áreas enzoóticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 22(7): 747-52.
- KESSLER, R. H.; SACCO, A. M. S.; JESUS, E. F. de & MADRUGA, C. R. (1987b) Desenvolvimento de cepas vivas atenuadas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*: Teste preliminar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 22(11-12): 1225-30.
- KUTTLER, K. L. (1988) World-wide impact of babesiosis. In: *Babesiosis of domestic animals and man*, RISTIC, M. (ed.). CRC Press, Boca Raton, p.1-22.
- LIMA, J. D. (1991) Premunicação: uma alternativa para o controle da tristeza parasitária. In: *Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 7., São Paulo, 1991. *Anais*. São Paulo, p.39-43.
- MCCOSKER, P. J. (1981) The global importance of babesiosis. In: *Babesiosis*, RISTIC, M. & KRIER, J.P. (eds.). Academic Press, New York, p.1-24.
- NARI, A.; SOLARI, M. A. & CARDOSO, H. (1979) Hemovacuna para el control de *Babesia* spp y *Anaplasma marginale* en el Uruguay. *Veterinaria Uruguai*, 15(77): 137-45.
- OMETTO, J. C. (1981) *Bioclimatologia vegetal*. Ed. Agronômica Ceres, São Paulo, 425p.
- PALMER, G. H. (1989) *Anaplasma* vaccines. In: *Veterinary protozoon and hemoparasite vaccines*. WRIGHT, I.G. (ed.) CRC Press, Boca Raton, p.1.
- PAYNE, R. C.; OSÓRIO, O. & IBÁÑEZ, A. (1990) Tick-borne diseases of cattle in Paraguay. II. Immunization against anaplasmosis and babesiosis. *Tropical Animal Health and Production*, 22: 101-8.
- PIPANO, E.; MAYER, E. & FRANK, M. (1985) Comparative response of Friesian milking cows and calves to *Anaplasma centrale* vaccine. *British Veterinary Journal*, 141: 174-77.

(Received 14 December 1993, Accepted 24 March 1994)