

# DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS ANTI-BABESIA spp. EM BEZERROS BUBALINOS (*BUBALUS BUBALIS*), DESDE O NASCIMENTO ATÉ UM ANO DE IDADE.

C. L. DA COSTA<sup>1</sup>, A. KOHAYAGAWA<sup>2</sup>, A. DELL' PORTO<sup>3</sup>, S. R. M. BOMFIM<sup>3</sup>.

(1) Bolsista IC - FAPESP; (2) Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Campus de Botucatu, 18618-000, Botucatu, SP, Brasil; (3) Departamento de Parasitologia-Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

**SUMÁRIO:** A imunidade passiva (anticorpos colostrais) e a imunidade ativa (infecção natural) contra *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* foram estudadas em um grupo de 20 bezerros bubalinos (*Bubalus bubalis*), subdivididos em 10 machos e 10 fêmeas de zero até um ano de idade, provenientes de uma fazenda do município de Sarapuí - SP. Os anticorpos humorais foram determinados mediante a prova de Imunofluorescência Indireta (IFI) em soros sanguíneos dos bezerros após o nascimento (dentro de 48 horas), aos 15 dias, aos 30 dias e mensalmente até 1 ano de idade. Da mesma maneira, foi obtido o sangue total com anti-coagulante EDTA a 10% para a determinação do Volume Globular (VG) dos animais testados pelo método do micro-hematócrito. Os animais apresentaram os maiores valores do hematócrito dos 2 aos 120 dias de idade, seguido de um decréscimo significativo dos valores até 1 ano de idade. Apenas 3 animais apresentaram sorologia positiva para *Babesia* spp., sendo um macho e uma fêmea reagentes à *B. bovis*, com queda dos níveis de anticorpos colostrais aos 30 e 15 dias de idade respectivamente; duas fêmeas reagentes à *B. bigemina* com queda dos níveis aos 2 e 15 dias de idade. Uma dessas fêmeas adquiriu a infecção por *B. bigemina* aos 12 meses de idade. O grande número de animais não reagentes deve-se, provavelmente, à maior resistência dos bubalinos ao vetor da *Babesia* spp., o carrapato *Boophilus microplus*, demonstrando não haver estabilidade enzoótica no estabelecimento estudado.

**PALAVRAS - CHAVE:** bubalinos, bezerro bubalino, babesiose, imunidade.

## INTRODUÇÃO

Os búfalos abrigam muitos parasitas comuns aos bovinos, incluindo os piroplasmas, em grande parte do mundo (MOHAN, 1968); porém há poucas informações na literatura com relação à dinâmica da infecção por *Babesia* spp. em búfalos. Tendo em vista que, em bovinos, estes protozoários causam grandes perdas econômicas no Brasil, há a importância de se conhecer a resposta humoral dessa infecção em animais que estão se tornando cada vez mais interessantes em nossa pecuária, como é o caso dos bubalinos.

A babesiose é uma doença que apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrada com maior frequência em regiões tropicais e subtropicais. Seus agentes causais, a *Babesia bovis* e a *Babesia bigemina*, são transmitidos, na América do Sul, por carrapatos *Boophilus microplus* (HICA, 1987). O período de incubação da *Babesia* spp. varia de 5 a 14 dias. A doença causa no hospedeiro febre, anorexia, anemia, hemoglobinemia, hemoglobinúria e icterícia (MAHONEY, 1977; JAIN, 1986; BLOOD *et alii*, 1994) e, entre os bubalinos, torna-se um agravante ainda maior quando associada com outras parasitoses, resultando em crescimento limitado dos bezerros e outros prejuízos, tais como: baixa na produção de leite e carne (SHARMA *et alii*, 1985).

Os bovídeos ao nascerem, podem apresentar imunidade passiva desde que anticorpos maternos sejam absorvidos pelo bezerro através do colostro. Esta imunidade é gradualmente substituída por imunidade ativa através da infecção natural. Porém é freqüente a ocorrência da hipogamaglobulinemia em bezerros devido a problemas de manejo e esses tornam-se susceptíveis à doenças infecciosas neonatais, razão pela qual os padrões de higiene e manejo precisam ser melhorados (BLOOD *et alii*, 1994).

A IgG é a imunoglobulina predominante no colostro dos animais domésticos, correspondendo de 65 a 90% do total das imunoglobulinas colostrais (TIZARD, 1992). Nas búfalas, 80% das proteínas do colostro são representadas pelas imunoglobulinas, o que revela sua importância durante as semanas iniciais de vida do bezerro (SILVA, 1989). Segundo GILHONNA *et alii* (1987), o tempo de administração também é importante, pois além do fenômeno chamado de "fechamento" do trato digestivo do bezerro, as concentrações de IgG colostrais da mãe bubalina sofrem significante decréscimo entre 4 e 60 horas pós-nascimento.

Sabe-se que os búfalos são menos exigentes que os bovinos em alimentação e mais resistentes às doenças. Segundo C. ALLOW (1976), as mesmas espécies de *Babesia* que infectam os bovinos podem infectar bubalinos, manifestando-se clinicamente de forma semelhante. No entanto, observou-se que a proporção de búfalos que apresenta a doença clínica é menor quando comparada com a de bovinos. Entretanto, MOTTELIB (1987), estudando alguns aspectos clínicos da infecção experimental por *B. bigemina* em bezerros bubalinos, verificou que animais com baixa resistência orgânica podem desenvolver a doença de forma bastante severa. Em nosso meio tem-se observado, a nível de campo, que não é incomum o encontro de animais com sinais clínicos de babesiose, principalmente em bezerros de 3 a 6 meses de idade (FRANZOLIN NETO *et alii*, 1989).

Normalmente a babesiose é diagnosticada pelo encontro de hemácias parasitadas em esfregaços sangüíneos. Porém, em casos de infecções crônicas e/ou subclínicas, a possibilidade de encontrar o parasita é bastante pequena ou mesmo nula. Desta maneira, torna-se questionável o emprego desta metodologia em estudos de epidemiologia e de dinâmica de infecções, sendo mais recomendado o uso de técnicas sorológicas (MAHONEY, 1977).

Considerando-se que os bubalinos são mais resistentes a determinadas doenças que os bovinos e, baseando-se nos resultados de GUIDO *et alii* (1994) que, dentre 500 búfalos, todos apresentaram-se negativos aos esfregaços e 49,4% foram positivos ao teste de Imunofluorescência Indireta para *Babesia* spp. optou-se, no presente estudo, pelo emprego desta metodologia para acompanhar a dinâmica da infecção por *B. bigemina* e *B. bovis* nos animais desta espécie.

Assim sendo, este trabalho teve como objetivos:

- Determinar os níveis de anticorpos anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em soros de bezerros bubalinos, criados em condições naturais, após o nascimento (dentro de 48 horas), ao 15º dia, 30º dia e mensalmente até 1 ano de idade, pelo teste de Imunofluorescência Indireta (IFI).
- Comparar se há diferença entre machos e fêmeas com relação aos níveis de anticorpos anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina*.
- Determinar o volume globular (VG) dos bezerros bubalinos testados e sua possível correlação com os níveis de anticorpos anti-*Babesia* spp..

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 bezerros bubalinos (*Bubalus bubalis*) do nascimento até um ano de idade, sendo 10 machos e 10 fêmeas clinicamente sadios, provenientes da Fazenda Paineiras, localizada na cidade de Sarapuí - SP, cuja finalidade da criação exclusiva de búfalos e de produção leiteira e derivados. As amostras para exames laboratoriais, como sangue total para hematócrito e soro para realização do teste de Imunofluorescência Indireta (IFI), foram colhidas após o nascimento (dentro de 48 horas), ao 15º dia, 30º dia e mensalmente até 1 ano de idade.

O Volume Globular foi determinado pelo método do micro-hematócrito, sendo preenchidos dois terços de um tubo capilar sem heparina e processado conforme JAIN (1986). O teste de Imunofluorescência Indireta (IFI), segundo metodologia de DELA PORTO *et alii*, (1990), foi empregado para diagnóstico de anticorpos contra *B. bovis* e *B. bigemina*, utilizando-se como controles soro negativo, positivo e o também positivo (PI 7.2). O conjugado anti-búfalo foi utilizado na diluição de 1:20 e os soros a partir da diluição 1:40.

Foram realizadas determinações de média aritmética, desvio padrão, variância e coeficiente de variação para os dados obtidos do VG dos bezerros bubalinos testados ao longo da faixa etária.

## RESULTADOS

Na Figura 1 pode-se verificar a variação do Volume Globular (VG) de zero até um ano de idade através das médias por faixa etária dos bezerros bubalinos testados. A média variou de 33 a 42% e os animais apresentaram o valor do hematócrito mantido alto entre 2 e 120 dias de idade.

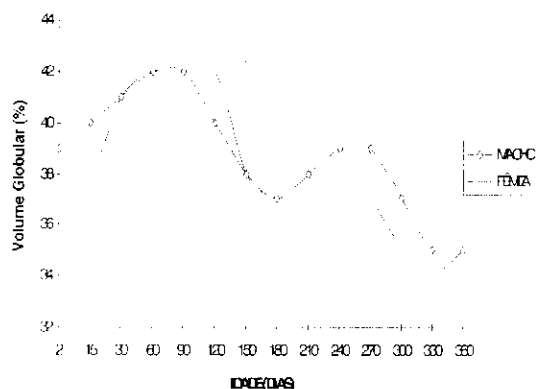


Fig.1- Variação do Volume Globular (%) de zero até um ano de idade através das médias por faixa etária dos bezerros bubalinos testados.

Dentre as 267 amostras de soro examinadas, apenas 8 mostraram-se positivas ao Teste de Imunofluorescência Indireta, com títulos de *B. bigemina* e *B. bovis* variando de 1:40 a 1:80. Na Figura 2, encontram-se os valores individuais dos títulos de anticorpos apresentados por um macho e duas fêmeas. Devido ao baixo número de animais positivos, estes resultados não puderam ser submetidos à análise estatística.

Nas lâminas de antígeno para o teste de Imunofluorescência Indireta, os parasitas achavam-se distribuídos igualmente por toda a lâmina, apresentando-se aos pares ou isolados, formando aglomerados. Nas preparações positivas ao teste de IFI, os parasitas apresentaram um halo de fluorescência bastante intensa, de coloração verde citrino. Nas preparações negativas não se observou fluorescência nos parasitas ou nas hemácias quando o soro era usado na diluição de 1:40. Nessas preparações, os parasitas dos aglomerados apresentaram-se esverdeados, porém sem fluorescência.

## DISCUSSÃO

**Volume Globular:** As médias do VG obtidas neste experimento (Figura 1) nas diferentes faixas etárias e sexo constantes, foram comparadas com as encontradas por BOKORI (1974), MALIK *et alii* (1974) e SILVA *et alii* (1992) e observa-se que as mesmas foram superiores às desses autores. Entretanto, foram semelhantes aos valores obtidos por BOTELHO *et alii* (1991) e SILVA *et alii* (1992) que estudaram os valores hematológicos de bezerros bubalinos das regiões do Estado do Rio de Janeiro e da região do Vale do Ribeira, respectivamente.

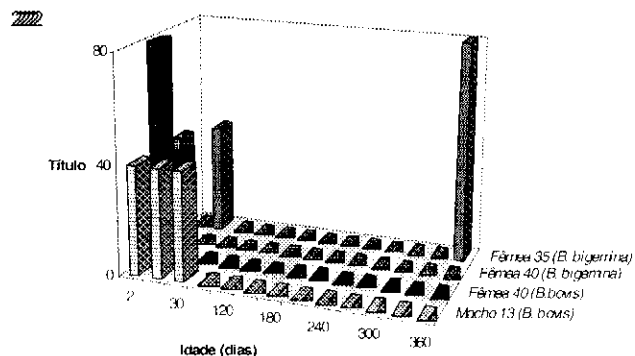


Fig.2 - Valores individuais dos títulos de anticorpos apresentados por um macho e duas fêmeas.

Pode-se verificar que os animais em ambos os sexos apresentaram valores elevados de hematócrito entre 2 a 120 dias de idade e logo após ocorreu um decréscimo de forma significativa com o desenvolvimento etário em ambos os sexos concordando com as observações de REDA (1951), SILVA *et alii* (1992) e PATIL *et alii* (1992). Todos esses autores concordam que os maiores valores do VG ocorrem em animais jovens e diminuem com o desenvolvimento etário. PATIL *et alii* (1992) afirma que a alta taxa de metabolismo é verificada durante o crescimento animal, o que aumenta a taxa de eritropoiese resultando em alto número de eritrócitos. Não existe diferença no valor do hematócrito, tanto quanto ao sexo, como quanto à raça (SILVA *et alii*, 1992).

**Imunofluorescência Indireta:** Os soros foram triados inicialmente na diluição de 1:40. Na Figura 2 verifica-se que houve passagem de anticorpos colostrais contra *B. bigemina* em dois animais (fêmeas de números 35 e 40), e contra *B. bovis* em outros dois (macho número 13 e fêmea número 40). Os títulos observados variaram de 1:40 a 1:80. Um dos animais (fêmea número 35) voltou a apresentar resposta positiva à sorologia quando na idade de um ano.

Estes resultados podem confirmar a baixa ocorrência da babesiose em búfalos verificada por AMROUSI *et alii* (1974), ROYCHOUDHURY & GAUTAM (1979). MOHAN (1968), afirma que tal fato deve-se à resistência inata da espécie a essas infecções. CAMOENS (1976) associa a resistência aos carrapatos com o fato dos búfalos ficarem sempre banhados por lama quando o tipo de solo é favorável à formação desta. Tal fato vem ao encontro das observações feitas por FONSECA (1987) que, analisando várias fazendas do Brasil, evidenciou a lama como a principal defesa do búfalo contra ectoparasitas como o carrapato e, principalmente, contra o piolho (*Haematopinus tuberculatus*) pelo qual é frequentemente atacado.

Devido a estes fatores extrínsecos ligados à baixa infestação de carrapatos e à resistência natural da espécie aos mesmos, o grande número de bezerros bubalinos não reagentes à *B. bigemina* e à *B. bovis* pode sugerir que os bezerros não receberam imunoglobulinas colostrais contra *Babesia* spp. por serem provenientes de mães não imunes. Esta hipótese pode ser evidenciada pelo manejo de controle intenso e constante de ectoparasitas que é realizado na fazenda leiteira da qual provém os animais. Segundo BLOOD *et alii* (1994), nas estações em que a população de carrapatos diminui ou quando os animais são submetidos a um programa eficiente de controle de carrapatos, a infecção pode desaparecer e a imunidade ser perdida.

RIOS (1987) observou que bezerros provenientes de mães imunes apresentaram anticorpos colostrais para *B. berbera* e *B. bigemina*, enquanto que os bezerros sorologicamente negativos tinham baixa concentração de imunoglobulinas colostrais devido à inadequada ingestão do colostro, ou por redução da capacidade de absorção da mucosa intestinal do bezerro, idade do bezerro no momento da ingestão do colostro e baixa concentração de imunoglobulinas no soro das mães.

Dentre os 20 bezerros analisados neste experimento, observou-se a presença de anticorpos colostrais em 3 deles, com títulos máximos de 1:80. Dos bezerros machos, nenhum foi reagente à *B. bigemina* e apenas um apresentou anticorpos colostrais anti-*B. bovis*, havendo a detecção desses anticorpos até 30 dias de idade. Das fêmeas, uma mostrou-se reagente à *B. bigemina* e à *B. bovis*, apresentando anticorpos colostrais aos 2 e até os 15 dias de idade para *B. bigemina* e *B. bovis*, respectivamente. Apenas uma fêmea apresentou níveis de anticorpos colostrais contra *B. bigemina* aos 15 dias de idade e adquiriu anticorpos aos 12 meses de vida contra a mesma infecção (Figura 2).

Os anticorpos apresentados por estes animais provavelmente foram adquiridos pela ingestão do colostro da mãe imune que teve contato com os parasitas. Apenas uma fêmea adquiriu anticorpos contra *B. bigemina* aos 12 meses de idade, o que poderia ter sido consequência de infecção adquirida no campo. Entretanto, este pode ser apenas um fator coincidente e não implica que os outros animais analisados não venham a desenvolver a infecção mais tarde.

O baixo número de animais positivos encontrados neste experimento não permitiu a avaliação estatística dos resultados e nada pode-se afirmar sobre a diferença entre machos e fêmeas com respeito à dinâmica da infecção por *Babesia* spp. em búfalos. Pelo mesmo motivo, foi impossível correlacionar níveis de infecção e de anticorpos anti-*Babesia* com o VG. Portanto, torna-se de extrema importância a realização de mais trabalhos de tal natureza, inclusive com a correlação dos níveis dos anticorpos maternos, para estabelecer parâmetros literários epidemiológicos sobre a dinâmica da infecção por

*Babesia* spp. em búfalos, animais que estão se tornando cada vez mais importantes em nossa pecuária e contribuem, de certa forma, para o estudo da babesiose em bovinos, os quais são constantemente atacados por estes hemoparasitas que causam grandes prejuízos em nossos rebanhos. A propriedade, onde foi desenvolvido o experimento, apresentou um número muito baixo de animais soropositivos encontrando-se em situação de instabilidade enzoótica para a babesiose.

## SUMMARY

Passive immunity (colostral antibodies) and active immunity (natural infection) against *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* were studied in twenty (20) buffaloes calves (*Bubalus bubalis*), ten males and ten females from zero to one year old, on a farm located in Sarapuí, State of São Paulo, Brazil. Humoral antibodies were determined by the indirect fluorescent antibody test (IFA) in blood serum from calves after their birth (until 48 hours), 15 days old, 30 days of age and monthly until one year old. Their total blood was mixed with EDTA 10% (anticoagulant) to determine packed cell volume (PCV) by the microhaematocrit method. High levels of PCV were found between 2 and 120 days of age followed by a significant reduction until one year old. Only three animals were positives to *Babesia* spp.: one male and one female reacted against *B. bovis* and their colostral antibodies levels became reduced at 30 and 15 days, respectively; two females reacted against *B. bigemina* and their antibodies levels became reduced at 2 and 15 days of age. One of these two females acquired the infection from *B. bigemina* at 12 months of age. Probably, the majority of these animals were not reactive because the buffaloes are more resistant to *Boophilus microplus*, the *Babesia* spp. vector, and also because in the studied farm there is not enzootically stability.

KEY WORDS: buffaloes, buffalo calf, babesiosis, immunity.

## REFERÊNCIAS

- AMROUSI, S.; SHERRY, M.I. & ALLAWY, T.A. (1974). Pathological study on the effect of *Babesia bigemina* experimental infection in splenectomised and nonsplenectomised Egyptian cow and buffalo calves. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 1:25-37.
- BLOOD, D.C.; RADOSTIS, O.M. & ARUNDEL, J.H. (1994). *Veterinary Medicine*. 8. ed. Baillière Tindall. London, England, 1763 p.

- BOKORI, J. (1974). Contribution to the haemograms of the buffalo and of the camel. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, 24:73-76.
- BOTELHO, G.G.; LOBATO, E.T.; PEREIRA, G.P.; NOGUEIRA, G.P.; LONGUI, J.L. & ROSSETTI, D.T.G. Avaliações hematológicas em bubalinos (*Bubalus bubalis*) criados no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. (1991). *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, 14 (2):171-178.
- CALLOW, I.L.; PARKER, R.J.; RODWELL, B.J. & OTTLEY, M.L. (1976). Piroplasmosis in Buffaloes and its serological diagnosis based on a homology between buffalo and bovine immunoglobulins. *Australian Veterinary Journal*, 52:40-41.
- CAMOENS, J.K. (1976). The buffalo in Malaysia. *Bulletin Ministry of Agriculture Malaysia*, (145):1-184.
- DELL'PORTO, A.; OLIVEIRA, M.R. & MIGUEL, O. (1990). *Babesia canis* em cães de rua da cidade de São Paulo. I. Estudo comparativo de métodos de diagnóstico. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 27 (1):41-45.
- FONSECA, W. (1987). *Búfalo: estudo e comportamento*. Icone, São Paulo, Brasil, 213 p.
- FRANZOLIN NETO, R.; DELL'PORTO, A. & LACAZ RUIZ, R. (1989). Anaplasmosis and babesiosis: a clinical case in buffalo (*Bubalus bubalis*) calf in Brazil. *Buffalo Bulletin*, 8(3): p. 68.
- GHIONNA, C.M.; VERNA, M.; CATILLO, G. et alii. (1987). Chemical composition of water buffalo colostrum in six milkings after calving. *Annali dell' Istituto Sperimentale per la Zootechnia*, 20:59-72.
- GUIDO, M.C.; DELL'PORTO, A.; FUJII, T.U. & ARTES, R. (1994). Prevalence of hemoparasites in buffaloes from Ribeira Valley, south coast of São Paulo State - Brazil. IVth World Buffalo Congress. São Paulo, Brazil, p. 325-327.
- IICA (1987). Comité de Expertos sobre Hematozoários del Sur de IICA. *Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina*. IICA, San José, 179 p.
- JAIN, N.C. (1986). *Schalm's Veterinary hematology*. 4 ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 122 p.
- MAHONEY, D.F. (1977). Babesia of domestic animals. In: KREIER, J.P. *Parasitic protozoa*. Academic Press. New York, 4:1-52.
- MALIK, J.K.; CHAND, N.; SINGH, R.V.; SINGH, P.P.; BAHGA, H.S. & SUD, S.C. (1974). Hematology of male buffalo calves. *Indian Veterinary Journal*, 51 (2): 95-99.
- MOHAN, R.N. (1968). Diseases and parasites of buffaloes III. Parasitic and miscellaneous diseases. *Veterinary Bulletin*, 38: 736-738.
- MOTTELIB, A.A. (1987). Some studies on babesiosis of buffaloes in Egypt. 3rd International Conference on Malaria and Babesiosis. Annecy, France, p. 137.
- PATIL, M.D.; TALVELKAR, B.A.; JOSHI, V.G. & DESHMUKH, B.T. (1992). Haematological studies in Murrah buffaloes. *Indian Veterinary Journal*, 69:661-663.
- REDA, H. (1951). The hematologic examination of normal blood of egyptian buffaloes. *American Journal of Veterinary Research*, 7:23-25.
- RIOS, L.G. (1987). Inmunidad pasiva y activa *Babesia bovis* en terneros de un área enzoótica del noroeste argentino. *Revista Iberica de Parasitologia*, 47 (3):237-245.
- ROYCHOUDHURY, G.K. & GAUTAM, O.P. (1979). Experimental studies on the pathogenicity of *Babesia bigemina* in buffalo calves. *Tropical Animal Health and Production*, 11:91-93.
- SHARMA, M.C.; PATHAK, N.N.; LIEN, N.H.; AN, D.T.; NHI, D.L.; HUNG, N.N. & VUC, N.V. (1985). Effect of parasitic infections on the growth and milk production of Murrah buffaloes reared in humid-hot climate of Vietnam. 3rd AAAP Animal Science Congress, (The Organizing Committee), Seoul, Korea Republic, 2. 1255-1257.
- SILVA, M.B.; D'ANGELINO, J.L.; ARAÚJO, W.P.; GALIARDO, M.; GARCIA, M. & BIRGEL, E.H. (1992). Avaliação do eritrograma de búfalos (*Bubalus bubalis*) criados na região do Vale do Ribeira em S.P. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 29: 113-119.
- SILVA, M.C. (1989). Imunidade passiva adquirida através do colostro em bubalinos (*Bubalus bubalis* Lin.) recém-nascidos da raça Murrah. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 76 p.
- TIZARD, I. (1992). *Veterinary Immunology: An Introduction*. 4. ed. W B Saunders, Philadelphia, 498 p.

(Received 25 May 1996, Accepted 26 September 1996)