

TRANSMISSÃO TRANSOVARIANA DE *BABESIA BIGEMINA*, (SMITH & KILBORNE, 1893) POR PARTENÓGINAS DE *BOOPHILUS MICROPLUS* (CANESTRINI, 1887).

T.R.B. SANTOS¹, J.C. GONZALES², J.M. CHIES³ & N.A.R. FARIAS⁴.

(1) Faculdade de Veterinária, UFPEL - Pelotas, RS, Brasil; (2) Faculdade de Veterinária, UFRGS - Porto Alegre, RS, Brasil; (3) Centro de Biotecnologia, UFRGS - Porto Alegre, RS, Brasil; (4) Instituto de Biologia, UFPEL, Cx. Postal, 354, CEP-96010-900 - Pelotas, RS, Brasil.

SUMÁRIO: O presente trabalho, objetivou o estudo do ciclo da *B. bigemina* no seu hospedeiro invertebrado, o carrapato *B. microplus*. Analisou-se a capacidade de infecção e transmissão transovariana de *B. bigemina* em partenóginas de *B. microplus*, alimentadas em bovinos portadores ou enfermos por este protozoário. No 18º dia após a infestação, coletou-se partenóginas diretamente do corpo dos bovinos e, a partir do 21º dia, teleóginas após o despredimento natural. Todos os grupos foram incubados a 27°C e umidade relativa superior a 70%. No 5º dia de postura realizou-se o exame de hemolinfa para o diagnóstico da infecção dos ínstares por *B. bigemina*. Posteriormente, o teste biológico revelou que as partenóginas, quando coletadas de bovinos em fase clínica de babesiose são capazes de transmitir este protozoário à sua progênie larval. Estes resultados, indicam que elevadas parasitemias do hospedeiro vertebrado por *B. bigemina*, podem infectar mais precocemente o carrapato.

PALAVRAS - CHAVE: *Babesia bigemina*, *Boophilus microplus*, biologia, epidemiologia, transmissão transovariana.

INTRODUÇÃO

A babesiose é uma enfermidade de grande importância econômica e na América Latina é transmitida pelo carrapato *Boophilus microplus* (GUGLIELMONE, 1995).

O conhecimento do ciclo evolutivo do *Boophilus microplus*, assim como do ciclo da *Babesia* spp. no carrapato, é indispensável para o controle da babesiose nos bovinos. No entanto, ainda são necessários mais estudos sobre a evolução biológica desses hematozoários em seus hospedeiros vertebrados e invertebrados.

A evolução de *B. bigemina* e *B. bovis* no carrapato *B. microplus* foi descrita por RIEK (1964, 1966) e YOUNG & MORZARIA (1986).

CALLOW (1968), utilizando a técnica de transferência artificial de diferentes estágios de *B. microplus* de bovinos portadores de *B. bigemina*, para bovinos livres e sensíveis à babesiose, associado ao uso de babesicidas, concluiu que o carrapato (teleóquina) somente se infecta, com esse protozoário, nas últimas 16 a 24 horas de repasto sanguíneo; porém, não são totalmente conhecidos os fatores que impedem a infecção

anterior a este período. Podem estar relacionados a uma digestão acelerada que destrói os protozoários (POLIANSKI & KHEISIN, 1959), ou a transformações das células basofílicas da parede intestinal para a síntese de vitelogenina, que as tornariam suscetíveis à infecção por *Babesia* spp. (AGBEDE *et alii*, 1986).

Nos bovinos, segundo LOSOS (1986), os protozoários são geralmente observados pela primeira vez nos eritrócitos, 8 a 16 dias após a infecção por *Babesia* spp. A parasitemia é acompanhada por febre de 41 a 41,5°C, e posteriormente o animal torna-se apático, anorético, desidratado e fraco, ocorrendo tremores musculares e ranger de dentes. Ocorrem hemoglobinemia e hemoglobinúria, com posterior icterícia, as fezes ficam amareladas e secas, podendo também apresentar sangue.

O isolamento de variedades puras, tanto de *B. microplus* como *Babesia* spp., é o alicerce para inúmeros trabalhos, como: produção de antígenos puros para testes sorológicos e vacinas, a obtenção de variedades de carrapatos infectadas somente por uma espécie de *Babesia* e, também, para estudos comparativos entre as espécies de *Babesia*. Um maior conhecimento sobre a dinâmica de infecção do carrapato por *B. bigemina*, e sua capacidade de transmissão transovariana, podem facilitar a obtenção desse material.

MATERIAL E MÉTODOS

O objetivo do trabalho foi constatar a ocorrência ou não de transmissão transovariana de *B. bigemina* em partenóginas (fêmeas parcialmente ingurgitadas) de *B. microplus*.

Para tanto, foram avaliadas progênes de partenóginas alimentadas em terneiros durante as fases clínica e sub-clínica de babesiose por *B. bigemina*. A avaliação da infecção dessas larvas foi feita através da infestação de bezerros sensíveis, esplenectomizados e posterior acompanhamento clínico dos mesmos.

Local de execução: O presente trabalho foi realizado no Setor de Entomozooses, Faculdade de Veterinária da UFRGS, em Porto Alegre, RS, Brasil.

Bovinos: Foram utilizados um total de dez bezerros, oriundos de Santa Vitória do Palmar - RS, região livre de carrapato, e consequentemente de *Babesia* spp.

Carrapatos: Foi utilizada uma cepa de carrapato uma originada do município de Bagé - RS, artificialmente livre de *Babesia* spp. após tratamento químico do bovino hospedeiro (FARIAS, 1994). Posteriormente, essa cepa foi infectada com isolado puro de *Babesia bigemina* (FARIAS, 1994).

Obtenção de carrapatos de bovinos durante a fase subclínica de babesiose: Dois bezerros não esplenectomizados e previamente inoculados com *B. bigemina* (portadores) receberam, cada um em dias alternados, 3 infestações com 10.000 larvas *B. microplus* infectadas com *B. bigemina*. No 12º dia após a primeira infestação, foram inoculados, via venosa, com 6 ml de sangue, contendo *B. bigemina* ($10,8 \times 10^7$ e $47,7 \times 10^7$ Unidades Infectantes (UI)/ml, respectivamente).

As partenóginas (fêmeas semi-ingurgitadas, com sulcos visíveis) foram coletadas a partir do 18º dia após a primeira infestação, diretamente do corpo do animal e as teleóginas (fêmeas totalmente ingurgitadas) após seu desprendimento natural do hospedeiro, a partir do 21º dia. (Figura 1).

Foi considerada fase subclínica, quando os bovinos não apresentavam sintomas como queda de hematócrito, elevação de temperatura e não havia presença de *Babesia* spp nos esfregaços sanguíneos.

DIA: 0 2 4	12	18 20 22 24 26 28
infestação com larvas de <i>B. microplus</i> com <i>B. bigemina</i>	inoculação de sangue com <i>B. bigemina</i>	coleta de partenóginas teleóginas

Fig. 1 - Representação esquemática da técnica utilizada para a obtenção de partenóginas e teleóginas alimentadas em bovinos portadores de *B. bigemina*.

Obtenção de carrapatos de bovinos durante a fase clínica de babesiose: Foram utilizados 2 bezerros livres de *Babesia* spp e esplenectomizados, os quais foram infestados nos dias 0, 2, e 4 com larvas livres de *Babesia* spp, para que a fase clínica não ocorresse antes do dia modal (dia de maior número de instares) das partenóginas e teleóginas.

Nestes bezerros foram inoculados 12 ml de sangue congelado em nitrogênio líquido contendo *B. bigemina* entre $10,8 \times 10^7$ e $47,7 \times 10^7$ UI/ml, no 12º dia após a primeira infestação com larvas livres.

As coletas de partenóginas e teleóginas foram realizadas do 18º ao 28º dia após a primeira infestação. Foi considerada fase clínica, quando os bovinos apresentavam sintomas como queda de hematócrito, elevação de temperatura e presença de *Babesia bigemina* nos esfregaços sanguíneos.

Formação dos grupos: Os grupos de partenóginas foram identificados como P e os de teleóginas como T. De acordo com o grau de infecção dos bovinos (fase subclínica ou fase clínica), por ocasião da coleta dos instares de carrapatos, os grupos foram identificados de s ou c. Assim, foram formados grupos Ps e Ts (partenóginas e teleóginas, respectivamente, coletadas de bovinos em fase subclínica de *B. bigemina*), e grupos Pc e Tc (partenóginas e teleóginas, respectivamente, coletadas de bovinos em fase clínica de *B. bigemina*).

Cada grupo (Ps, Ts, Pc, Tc) contou com uma repetição que foi designada de a (Psa e Tsa; Pca e Tca), segundo a metodologia referida anteriormente. Os grupos P foram constituídos por 140 partenóginas com um peso total de 7 gramas. Os grupos T foram constituídos de 50 teleóginas com peso total de 15 gramas.

Procedimento com os grupos: Todos os grupos foram incubados em placas de Petri, a 27°C e umidade relativa superior a 70%. No 5º dia de postura foram realizados os exames de hemolinfa, baseados em MAHONEY & MIRRE (1971).

No 20º dia de postura foram selecionados os ovos férteis (ovos com aparência brilhante e visualização do embrião, selecionados com auxílio de lupa) de cada grupo e, após uma homogeneização da massa de ovos, foram incubados em tubos de ensaio, em alíquotas de 0,5g a fim de se obter larvas infestantes para o teste biológico com os bovinos.

Teste biológico: Nos testes biológicos foram utilizados 6 bovinos adquiridos em zona livre de carrapato e de *Babesia* spp (Santa Vitória do Palmar - RS), com aproximadamente 6 meses de idade, e sorologicamente negativos a *Babesia* spp, que foram esplenectomizados.

Os terneiros foram mantidos no Setor de Entomozooses - Faculdade de Veterinária - UFRGS - Porto Alegre - RS, em baias individuais e isoladas com telas, para evitar infecções acidentais por hematozoários, além de *Anaplasma marginale* e *Eperythrozoon* sp.

Desses bovinos, 4 foram infestados com larvas oriundas dos grupos P, e 2 utilizados para testar a progênie dos grupos T.

Todos os animais utilizados no teste biológico sofreram exame clínico diário, até o final da produção de teleóginas (25-27 dias pós infestação), através de tomadas de temperatura retal, hematócrito e exame microscópico de esfregaço sangüíneo corado por Giemsa, observando-se, assim, a inoculação ou não de *Babesia bigemina* pela progênie dos diferentes grupos.

Teste sorológico: Foram coletados 20 ml de sangue sem anticoagulante de cada bovino utilizado no teste biológico, antes de serem infestados e 30 dias após o término de produção de teleóginas.

O soro oriundo desse sangue, após centrifugação, foi enviado para o Instituto de Pesquisas Desidério Finamor - Guaíba - RS, onde foi realizado o teste de ELISA, segundo ROITT *et alii* (1989), para a detecção de anticorpos anti-*Babesia*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que as partenóginas ingurgitadas em bovinos em fase subclínica de babesiose por *B. bigemina* não transmitiram o protozoário à sua progênie.

Na Tabela 1 observa-se que o exame de hemolinfa dessas partenóginas (grupos Ps e Psa) foi negativo. Os bovinos utilizados no teste biológico com sua progênie não manifestaram alterações significativas de temperatura retal e hematócrito e o teste sorológico realizado posteriormente, também foi negativo, confirmando a ausência de infecção nos bovinos. Nas teleóginas ingurgitadas nesses animais (grupos Ts e Tsa) o exame de hemolinfa revelou a infecção por *Babesia*. A progênie do grupo Ts (com menor índice de infecção) foi utilizado no teste biológico. O bovino infestado com essas larvas apresentou quadro clínico de babesiose no 21º dia após infestação (temperatura retal de 40,2°C, queda de 57% do hematócrito e presecção do parasita no esfregaço sanguíneo). Os sinais clínicos e período de incubação foram similares aos descritos por LOSOS (1986) e HOYTE (1961 e 1965).

Tabela 1 - Infecção de partenóginas e teleóginas de *B. microplus*, alimentadas em bovinos na fase subclínica de babesiose por *B. bigemina*, e capacidade de transmissão transovariana do protozoário.

Grupo	Exame de hemolinfa <i>B. microplus</i>	Bovinos infestados com a progênie larval		
		Teste biológico	ELISA	
			<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>
Ps	-	-	-	-
Ts	+ (20%)	+	-	+
Psa	-	-	-	-
Tsa	+ (42%)	NR	NR	NR

Ps - Partenóginas coletadas de bovinos com *B. bigemina* em fase subclínica.
Ts - Teleóginas coletadas de bovinos com *B. bigemina* em fase subclínica.
a - repetição.
NR - não realizado.

O fato de não ocorrer infecção por *B. bigemina* em partenóginas coletadas de bovinos em fase subclínica, como o verificado por CALLOW (1968), pode ser devido à baixa concentração de de parasitas no sangue do hospedeiro, à digestão acelerada que ocorre na fase inicial de ingurgitamento, sugerida por POLIANSKI & KHEISEN (1959) ou às células basofílicas do intestino não estarem sucetíveis à invasão do protozoário (AGBEDE *et alii*, 1986).

Nos carrapatos ingurgitados em bovinos em fase clínica de babesiose (Tabela 2) observou-se que, embora o exame de hemolinfa das partenóginas do grupo Pc tenha sido negativo, o teste biológico, revelou a infecção da progênie. Segundo MAHONEY & MIRRE (1971), existe um percentual de falsos negativos no exame de hemolinfa mesmo em teleóginas, também verificado por FARIAS (1994), o que ocorreu com as partenóginas no presente experimento.

Já o exame de hemolinfa do grupo de partenóginas (Pca) foi positivo, demonstrando um percentual de infecção de 34%.

As progênies de ambos os grupos de partenóginas foram capazes de transmitir a infecção no teste biológico. Os bovinos infestados com as larvas desses grupos manifestaram sinais clínicos como elevação de temperatura retal atingindo um máximo de 42°C, o hematócrito sofreu uma queda de 63%, sendo observado hemoglobinúria e hemoglobinemia, conforme o verificado por LOSOS (1986). O período de incubação variou entre 16 e 17 dias após a fixação das larvas, concordando com o descrito por HOYTE (1961, 1965).

O teste sorológico realizado posteriormente, demonstrou a presença de anticorpos apenas anti-*B. bigemina*, confirmando que a variedade de carrapato estava infectada apenas por essa espécie.

Os grupos de teleóginas ingurgitadas durante a fase clínica (Tc e Tca), demonstraram, no exame de hemolinfa, percentuais de infecção de 98% e 100%, respectivamente. As teleóginas do grupo Tca, encontravam-se hemorrágicas, devido a grande multiplicação de *Babesia* em seu intestino, provocando ruptura e mistura do conteúdo intestinal com a hemolinfa do carrapato. Assim, na lâmina de hemolinfa foram detectadas hemácias e um grande número de vernículos em decomposição.

Tabela 2 - Infecção de partenóginas e teleóginas de *B. microplus*, alimentadas em bovinos na fase clínica de babesiose por *B. bigemina*, e capacidade de transmissão transovariana do protozoário.

Grupo	Exame de hemolinfa <i>B. microplus</i>	Bovinos infestados com a progênie larval		
		Teste biológico	ELISA	
			<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>
Pc	-	+	-	+
Tc	+ (98%)	+	-	+
Pca	+ (34%)	+	-	+
Tca	+ (100%)	NR	NR	NR

Pc - Partenóginas coletadas de bovino com *B. bigemina* em fase clínica.
Tc - Teleóginas coletadas de bovino com *B. bigemina* em fase clínica.
a - repetição.
NR - não realizado.

Essas teleóginas, interromperam a postura em torno do 7º dia e o pequeno número de ovos postos foi infértil.

A progênie do grupo Tc, foi utilizada para o teste biológico, e o bovino infestado manifestou hipertermia (atingindo um máximo de 41,6°C), uma queda de hematócrito de 63%, hemoglobínúria e hemoglobinemia, conforme o descrito por LOSOS (1986). No 15º dia após infestação foi detectado a presença de *B. bigemina* por exame direto. O período de incubação observado, foi mais curto do que o descrito por HOYTE (1961, 1965), provavelmente devido ao alto inóculo e à sensibilidade do bovino.

O teste sorológico realizado posteriormente, revelou a presença de anticorpos, apenas, anti-*B. bigemina*, confirmando a pureza da cepa utilizada.

Os resultados revelam a ocorrência de transmissão transovariana de *B. bigemina* por partenóginas (coletadas no mínimo, 48 horas antes de seu ingurgitamento total) de *B. microplus*, quando alimentadas em bovinos em fase clínica da doença, o que não foi observado por CALLOW (1968), segundo o qual, somente nas últimas 16 a 24 horas de hematofagismo é que ocorre a infecção. Provavelmente, essa infecção tenha ocorrido devido ao grande número de parasitas ingeridos, e assim, apesar de muitos patógenos serem destruídos no intestino do carrapato, houve a sobrevivência de alguns, possibilitando a infecção.

SUMMARY

The work presented here was aimed at studying the life cycle *B. bigemina* on its invertebrate host, the tick *B. microplus*. The *B. bigemina* capacity of infection and transovarian transmission on *B. microplus* engorged females was assessed. The females used were fed either on cattle either carrier or clinical ill due *B. bigemina*. Until DAI 18, females were detached direct from hosts, and from DAI 21 on, they were collected after natural fall. All groups were incubated at 27°C and 70% relative humidity. After 5 days of oviposition, a haemolymph examination for *B. bigemina* was made. Further on the biological test showed that engorged females derived from clinical ill cattle are able to transmit *B. bigemina* to their offspring. Such results indicate that when the vertebrate host presents high levels of parasites on blood, tick infection is prone to occur early.

KEY WORDS: *Babesia bigemina*, *Boophilus microplus*, biology, epidemiology, transovarian transmission.

REFERÊNCIAS

- AGBEDE, R.I.S.; KEMP, D.H. & HOYTE, H.M.D. (1986) *Babesia bovis* infection of secretory cells in the gut vector tick *Boophilus microplus*. *International Journal for Parasitology*, v.16, n.2 p.109-114.
- CALLOW, L. L. (1968) The Infection of *Boophilus microplus* with *Babesia bigemina*. *Parasitology*, v.58, p.663-670.
- FARIAS, N. A. DA R. (1994) Efeito diferencial de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* sobre a capacidade reprodutiva do vetor *Boophilus microplus* - Rio de Janeiro, 134p. Dissertação (Doutorado - Biologia Parasitária) Fundação Oswaldo Cruz.
- GUGLIELMONE, A. A. (1995) Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*, v. 57, p. 109-119
- HOYTE, H. M. D. (1965) Further Observations on the Initial Development of Infections with *Babesia bigemina*. *Journal Protozoology*, v.12, p.83-85.
- HOYTE, H. M. D. (1961) Initial Development of Infections with *B. bigemina*. *Journal Protozoology*, v.8, p.462-466.
- LOSOS, G. J. (1986) Babesiosis In: LOSOS, G. J. *Infectious Tropical Diseases of Domestic Animals*. Longman Scientific, Technical, Canada, c.1. p.1-97.
- MAHONEY, D. F. & MIRRE, G. B. (1971) Bovine Babesiosis Estimation of Infection Rates in the Tick Vector *Boophilus microplus*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.65, n.3, p.309-317.
- POLIANSKI, I. & I. KHEISIN, E. M. (1959) Some observations on the development of *Babesia bovis* in tick vector. *Karel. Fil. Akad. Nauk* v.14, p.5-13.
- RIEK, R. F. (1964) The Life Cycle of *Babesia bigemina* (Smith, Kilborne, 1893) in the tick Vector *B. microplus* (Canestrini, 1887). *Australian Journal Agriculture Research*. v.15, p.802-82.
- RIEK, R. F. (1966) The Life Cycle of *Babesia argentina* (Lignieres, 1903) (Sporozoa: Piroplasmidea) in the tick Vector *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Australian Journal Agriculture Research*. v.17, p.247-254.
- ROITT, I. M.; BROSTOFF, J. & MALE, D. K. (1989) *Imunologia*. Ed. Manole Ltda, São Paulo, Brasil, 35.5
- YOUNG, A. S.; MORZARIA S. P. (1986) Biology of *Babesia*. *Parasitology Today*, v.2, n.8, p.211-219.

(Received 25 November 1996, Accepted 26 February 1997)