
**OBTENÇÃO DE ISOLADOS PUROS DE *Babesia bovis*
E *Babesia bigemina* A PARTIR DE LARVAS E NINFAS
DE *Boophilus microplus* EM BEZERROS NEONATOS
PRIVADOS DE COLOSTRO**

Francisco De Carvalho Dias Filho, ¹ Guido Fontgalland Coelho Linhares, ²
Sabrina Castilho Duarte ³ e Daniel Correia Lima Linhares ⁴

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de obter isolados puros autóctones de *B. bovis* e de *B. bigemina* a partir do carrapato *Boophilus microplus*, naturalmente infectado, assegurando, dessa forma, amostras de referência regional para futuros estudos sobre o tema. Os isolados puros de *B. bovis* e *B. bigemina* foram obtidos, respectivamente, através da infestação de bezerros neonatos privados de colostro com larvas e ninfas de *B. microplus*, naturalmente infectadas. A condição de isolados puros foi comprovada pela soroconversão específica pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), assim como pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e subinoculação. Os resultados confirmaram a eficácia da estratégia, anteriormente reportada, para isolamento puro de *B. bovis* e *B. bigemina* a partir de larvas e ninfas de carrapatos com infecções naturais. Concluiu-se ainda que o uso de bezerros neonatos privados de colostro, como animais suscetíveis, pode ser considerado um modelo prático, eficaz e relativamente econômico para o isolamento de hemoparasitos em regiões endêmicas.

DESCRITORES: *Babesia bigemina*. *Babesia bovis*. Isolados. Bezerros. Babesiose.

INTRODUÇÃO

Os protozoários *B. bigemina* e *B. bovis* são microrganismos intracitocitários que causam doença infecciosa caracterizada por quadro típico de anemia hemolítica nos bovinos. Nas Américas, estes agentes são transmitidos naturalmente pelo carrapato *Boophilus microplus*, encontrado entre os paralelos

1 Doutorando em Ciência Animal/Sanidade Animal, Universidade Federal de Goiás (UFG).

2 Professor Adjunto da Escola de Veterinária (EA), UFG.

3 Mestranda em Ciência Animal/Sanidade Animal, UFG.

4 Médico Veterinário.

Endereço para correspondência: Escola de Veterinária, Campus II, Cx. Postal 131, CEP: 74001-970. Tel.: (62) 3521-1582, ramal 27. E-mail: guidofcl@vet.ufg.br

Recebido para publicação em 18/10/2005. Revisto em 3/12/2005. Aceito em 8/12/2005.

32° N e 32° S (Gonzales 1995). Grisi et al. (2002) estimaram prejuízos anuais de 2 bilhões de dólares para a pecuária nacional, em decorrência da ação direta do *B. microplus* ou dos agentes patogênicos por ele transmitidos.

O clima predominantemente tropical do estado de Goiás favorece o ciclo de vida do *B. microplus*, disso decorre, portanto, sua grande incidência (Borges & Silva 1994). Esta situação epidemiológica justifica as altas taxas de prevalência de *B. bigemina* e *B. bovis* nos rebanhos da região, caracterizando uma condição de elevada estabilidade enzoótica (Linhares et al. 1992, Santos et al. 2001).

A diversidade genética tem sido demonstrada para espécies do gênero *Babesia* entre isolados de diferentes regiões geográficas, sendo esta responsável pelo polimorfismo antigênico que determina heterogeneidade intra-específica (Allred 2001). Considerando-se a extensão territorial do Brasil e o número expressivo de bovinos, pode-se inferir a existência de acentuadas variações no perfil molecular entre diferentes isolados ou cepas regionais (Madruga et al. 2002), o que justifica a necessidade de que sejam obtidos microrganismos de referência e colocados à disposição para estudos de epidemiologia molecular das populações autóctones.

Para o isolamento e a manutenção de amostras viáveis de hemoparasitos de bovinos, tem sido empregado meio de cultura de eritrócitos ou bovinos suscetíveis. O primeiro é considerado mais adequado tecnicamente, no entanto alguns fatores como o custo elevado e a necessidade de pessoal altamente qualificado limitam seu emprego (Bose et al. 1995).

Bovinos suscetíveis têm sido utilizados como alternativa para o isolamento de amostras puras a partir de carrapatos naturalmente infectados por *B. bigemina* e *B. bovis*. Essa estratégia se fundamenta no conhecimento de que *B. bigemina* é transmitida por ninfas e adultos de *B. microplus* (Callow & Hoyte 1961) e *B. bovis* apenas pelas larvas (Mahoney & Mirre 1979).

Como animais suscetíveis, utilizam-se bovinos procedentes de áreas livres (Dalglish & Stewart 1983; Ruiz et al. 1999) ou, ainda, bezerros nascidos em área endêmica que tenham sido mantidos fora do contato com *B. microplus* desde o nascimento até a perda total da imunidade colostrar (Kessler et al. 1987; Kessler et al. 1998; Barreira et al. 2005).

O presente trabalho teve como objetivo principal a obtenção de isolados autóctones puros de *B. bigemina* e *B. bovis* para a composição do banco de isolados de referência regional. Paralelamente foi avaliado o emprego de bezerros neonatos totalmente privados de colostro, como animais suscetíveis, para o isolamento dos respectivos microrganismos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção de isolados puros de *B. bovis* e de *B. bigemina*, foram inicialmente alojados seis bezerros totalmente privados de colostro, portanto desprovidos de imunidade materna. Os animais eram mestiços Holandês/Jersey

em perfeito estado de higiene, nascidos em local livre de carrapatos e transferidos para a área de isolamento na Escola de Veterinária (EV) da UFG, onde foram adotadas medidas de biossegurança para prevenir a entrada de vetores artrópodes. Foram observados os cuidados relativos à alimentação e ao ambiente, no sentido de proporcionar conforto e bem-estar animal. Os bezerros receberam dieta à base de leite *in natura*, na quantidade de três a quatro litros diários.

Com o objetivo de obter larvas e ninfas e *B. microplus*, infectadas por *Babesia* spp., foram colhidas 859 teleóginas de bezerros mestiços, entre 2 e 5 meses de idade, pertencentes ao rebanho bovino da EV/UFG. No laboratório foram higienizadas e distribuídas seis teleóginas por placa de Petri, fixadas com fita adesiva de dupla face, perfazendo um total de 143 placas. As placas foram então identificadas e incubadas em estufa B.O.D. a 27° C + ou - 1°C, umidade de 80% + ou - 10°C, conforme Thompson (1976). Ovos até o terceiro dia do início da postura eram eliminados para garantir maior taxa de infecção (Riek 1964, 1966). Após sete dias do início da postura, procedeu-se à análise da hemolinfa das teleóginas, segundo IICA (1987), para identificar os esporozoítos de *Babesia* spp. As teleóginas positivas foram mantidas na estufa para postura e as negativas descartadas. Os ovos das positivas foram pesados e acondicionados em seringas plásticas adaptadas, distribuindo-se 0,5 g de ovos, equivalente a 10.000 larvas, em cada uma das 15 seringas recolocadas na B.O.D. (Barreira et al. 2005).

As infecções experimentais dos bezerros suscetíveis, visando à obtenção dos isolados puros de *B. bovis* e *B. bigemina*, foram executadas empregando-se, respectivamente, larvas e ninfas de *Boophilus microplus* infectadas naturalmente, conforme Mahoney & Mirre (1979) e Callow & Hoyte (1961). No sétimo dia de vida, o bezerro nº 1 recebeu 20.000 larvas com dez dias de eclosão, contidas na região das duas orelhas em cápsulas de tecido e fixadas em sua base, segundo Kessler et al. (1987). Entre o quarto e o quinto dia da fixação das larvas procedeu-se à remoção mecânica das metalarvas que foram transferidas para o bezerro nº 2, contidas da mesma forma como descrito acima.

Os bezerros nº 3 e nº 4 foram mantidos, como controles, no mesmo ambiente e sob as mesmas condições de manejo, sem, contudo, receberem qualquer tipo de infestação ou inóculo.

Após a infestação e durante todo o período experimental os bezerros eram monitorados clínica e laboratorialmente duas vezes ao dia. A temperatura retal e sinais clínicos eram registrados em fichas individuais e, uma vez verificada alteração nos parâmetros normais, procedia-se à coleta de sangue com anticoagulante para a pesquisa microscópica de parasitos em preparações de esfregaço sanguíneo coradas pelo Giemsa e para a determinação do volume globular (VG) pela técnica convencional do microhematócrito. Para a avaliação do nível de parasitemia, adotou-se metodologia descrita pelo IICA (1987). Uma vez confirmada a infecção patente, colhia-se uma amostra de sangue com anticoagulante EDTA (Anticoagulante Universal, Doles) para extração de DNA total e outra com heparina (1mg/mL) para criopreservação.

Para a extração de DNA total, empregou-se *kit* comercial (GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit, Amersham Biosciences). As amostras de DNA foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) com a finalidade de comprovar a identidade molecular e a pureza dos isolados. Empregou-se, na reação, o par de *primers* GAU9/GAU10 para a amplificação espécie-específica de um fragmento do gene SSU rRNA de *B. bovis* e o par GAU6/GAU7 para *B. bigemina*, conforme Linhares et al. (2002). As amostras foram também submetidas ao teste de PCR específico para a amplificação de um fragmento do gene MSP1 de *A. marginale*, segundo Barbet & Allred (1991). O teste de PCR foi também aplicado às amostras de DNA total extraídas do sangue coletado dos bezerros no dia -1 das infestações por carrapatos.

As amostras de sangue heparinizado foram aliquotadas em tubos plásticos rosqueados de 3 ml e criopreservadas, sob a forma de estabilizado, em solução PBS/DMSO, conforme IICA (1987).

No dia -1 da infestação com carrapatos e 21 dias após o início da parasitemia patente, colheu-se ainda dos bezerros nº 1 e 2 amostras de sangue sem anticoagulante para a obtenção de soro com a finalidade de avaliar a soroconversão específica pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Os bezerros nº 3 e 4 também foram submetidos a este tipo de avaliação. As reações foram executadas em diluições seriadas do soro na escala de 1:10, a partir de 1:80 e até 1:5.120, segundo Todorovic & Long (1976). O conjugado (FITIC anti-IgG bovina, Sigma) foi utilizado na diluição de 1:350, conforme prévia titulação. Os antígenos empregados procederam da Universidade Federal de Minas Gerais, gentilmente cedidos pelo Dr. José Divino Lima.

Com a finalidade de comprovar a pureza e a viabilidade das amostras criopreservadas, os bezerros nº 5 e nº 6 foram subinoculados com 3 ml dos isolados criopreservados de *B. bovis* e *B. bigemina*, obtidos previamente nos bezerros nº 1 e nº 2, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 859 teleóginas de *B. microplus* mantidas para a produção de larvas e ninfas, 25,8% (n=222) apresentaram infecções por *Babesia* spp., evidenciadas pela presença de esporocinetos no exame da hemolinfa.

O bezerro nº 1, infestado com larvas de *B. microplus* obtidas de teleóginas infectadas naturalmente por *Babesia* spp., apresentou aumento da temperatura retal no 12º dia pós-infestação, ocasião em que foi detectada infecção patente por *B. bovis* com parasitemia estimada em 0,01%. Infecção patente por *B. bigemina* foi obtida no bezerro nº 2, com parasitemia de 0,1%, no 11º dia pós-infestação com ninfas de *B. microplus*. Os períodos prepatentes observados estão dentro dos valores padrões para as duas espécies, como já havia sido registrado na literatura (Losos 1986; Kessler et al. 1987; Kessler et al. 1998; Barreira et al. 2005).

A eletroforese dos produtos de PCR evidenciou o fragmento espécie-específico de 541 pb de *B. bovis* somente a partir da amostra de DNA total do bezerro nº 1, referente ao dia da parasitemia. Por outro lado, o resultado do ensaio de PCR para o fragmento espécie-específico de 685 pb de *B. bigemina* foi positivo apenas para a amostra do bezerro nº 2 do dia da parasitemia. Esses resultados confirmaram a identidade molecular e a pureza dos isolados de *B. bovis* e *B. bigemina*, nos bezerros nº 1 e 2, respectivamente (Quadro 1). Os resultados dos ensaios de PCR para *A. marginale* foram negativos para todas as amostras testadas, ou seja, referentes ao dia -1 e ao dia da parasitemia em ambos os bezerros.

Quadro 1. Resultados da PCR em DNA extraído de amostras de sangue colhidas em bezerros lactentes antes (D1) e após (DP) a infestação experimental com larvas (Bezerro nº.1) e ninfas (Bezerro nº 2) infectadas respectivamente com *B. bovis* e *B. bigemina* em Goiânia, 2005.

PCR espécie-específico	Bezerro nº 1		Bezerro nº 2	
	D1	DP	D1	DP
<i>B. bovis</i>	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
<i>B. bigemina</i>	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.

D1: dia anterior à infestação por larvas ou ninfas; DP: primeiro dia de parasitemia patente; Neg.: resultado negativo no exame de PCR; Pos.: resultado positivo no exame de PCR.

A sorologia pareada pela RIFI demonstrou soroconversão específica para *B. bovis* no bezerro nº 1, com resultado negativo no dia -1 e positivo até o título de 1:1.280 no 21º dia após o início da parasitemia. A soroconversão específica para *B. bigemina* foi evidenciada no bezerro nº 2 pela diferença entre o título zero no dia -1 e 1:640 no 21º dia após a parasitemia patente. Portanto, a soroconversão específica observada para *B. bovis* no bezerro nº 1 e para *B. bigemina* no bezerro nº 2, assim como os títulos das reações, representaram a confirmação sorológica da obtenção dos isolados puros dos respectivos hemoparasitos, com valores de títulos sorológicos dentro dos parâmetros reportados por outros autores (Ruiz et al. 1999; Mendonça et al. 2003).

Os bezerros nº 3 e 4, designados como controles, não apresentaram nenhuma manifestação clínica e a sorologia não revelou soroconversão deles.

Os bezerros nº 5 e 6, subinoculados com os estabilizados criopreservados de *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente, apresentaram infecções patentes puras. Os períodos prepatentes observados nesta etapa foram de 11 dias para *B. bovis* e de 7 dias para *B. bigemina*.

Os resultados alcançados referentes aos exames de PCR, sorologia (soroconversão específica) e subinoculação foram confirmatórios, comprovando serem equivalentes para a identificação dos protozoários em nível de espécie, como reportado por Böse et al (1995).

Neste estudo foi demonstrada a viabilidade do uso de bezerros neonatos, privados de colostro, como animais suscetíveis para a obtenção de isolados puros de hemoparasitos. Apesar da vulnerabilidade imunológica dos bezerros em razão da privação de colostro, nenhuma ocorrência foi registrada em consequência desta condição. As medidas sanitárias e de biossegurança adotadas durante todo o experimento, envolvendo os animais, o pessoal, os alimentos e o ambiente, provavelmente tenham contribuído para contornar o risco potencial.

As seguintes vantagens foram observadas com a utilização de bezerros neonatos como animais suscetíveis, quando comparado com outros métodos tradicionalmente aplicados (Dalglish & Stewart 1983; Kessler et al. 1987; Kessler et al. 1998; Barreira et al. 2005): custo irrisório dos animais experimentais e seu transporte, já que os bezerros eram descartes de granjas leiteiras da região; curto período de tempo de alojamento e manutenção dos animais em experimento; baixo custo com alimentação e manejo simplificado.

Apesar dos resultados alcançados, os autores alertam para a necessidade veemente de estrita precaução quanto à presença de carrapatos no local de nascimento e alojamento para os bezerros suscetíveis, quando o experimento for realizado em região endêmica para tristeza parasitária bovina. Da mesma forma, falhas nos cuidados com biossegurança e conforto animal podem produzir resultados indesejáveis.

Os resultados alcançados neste estudo referentes à obtenção de isolados puros de *B. bovis* e *B. bigemina* a partir de larvas e ninfas de *B. microplus*, respectivamente, comprovaram a eficácia dos métodos descritos originalmente por Callow & Hoyte (1961) e Mahoney & Mirre (1979) e também empregado por outros pesquisadores como Kessler et al. (1987), Kessler et al. (1998) e Barreira et al. (2005).

CONCLUSÕES

O emprego de larvas e de ninfas de *B. microplus*, procedentes de área endêmica para babesiose bovina na região de cerrado, foi adequado para a obtenção de isolados puros de *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente.

Nas condições em que foi desenvolvido o presente trabalho, pôde-se concluir que bezerros recém-nascidos e totalmente privados de colostro se revelaram adequados como animais suscetíveis para os experimentos envolvendo o isolamento de *B. bovis* e de *B. bigemina*.

AGRADECIMENTOS

O trabalho contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, entidade governamental brasileira promotora do desenvolvimento científico e tecnológico.

ABSTRACT

Pure isolates of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* obtained from *Boophilus microplus* larvae and nymphs in colostrum-deprived newborn calves

The present study was conducted with the main objective of obtaining pure autochthonous isolates of *B. bovis* and *B. bigemina* from naturally infected *Boophilus microplus* in order to provide regional reference samples for further studies. The pure isolates of *B. bovis* and *B. bigemina* were achieved by infesting susceptible colostrum-deprived newborn calves with naturally infected *B. microplus* larvae and nymphs, respectively. The status of pure isolates for each species was demonstrated either by fluorescent antibody specific seroconversion, polymerase chain reaction (PCR) or subinoculation. The results demonstrated the efficacy of the previous reported method to isolate *B. bovis* from larvae and *B. bigemina* from nymphs from naturally infected ticks. Finally, it was assumed that colostrum-deprived newborn calves might be used as a susceptible animal model to isolate hemoparasites in endemic areas, combining advantages such as effectiveness and feasibility with low cost.

KEYWORDS: *Babesia bigemina*. *Babesia bovis*. Isolates. Calves. Babesiosis.

REFERÊNCIAS

1. Allred DR. Antigenic variation in babesiosis: is there more than one 'why'? *Microbes Infect* 3: 481-491, 2001.
2. Barbet AF, Allred DR. The msp1 beta multigene family of *Anaplasma marginale*: nucleotide sequence analysis of an expressed copy. *Infect Immun* 59: 971-976, 1991.
3. Barreira JD, Doria Rossi MI, Silva GVO, Pires FA, Massard CL. Morphologic characterization of biological aspects of evolutive forms of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) (Protozoa: Babesiidae) in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Rev Bras Parasitol Vet* 14: 1-6, 2005.
4. Borges LMF, Silva RF. Ixodídeos parasitos de bovinos e eqüinos da microrregião de Goiânia, Goiás. *Rev Patol Trop* 23: 69-74, 1994.
5. Böse R, Jorgensen WK, Dalgliesh RJ, Friedhoff KT, Vos AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol* 57: 61-74, 1995.
6. Callow LL, Hoyte HMD. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* spp. and the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Aust Vet J* 37: 381-390, 1961.
7. Dalgliesh RJ & Stewart NP. The use of tick transmission by *Boophilus microplus* to isolate pure strains of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* from cattle with mixed infections. *Vet Parasitol* 13: 317-323, 1983.
8. Grisi L, Massard CL, Moya-Borja GE, Pereira JB. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet* 125: 8-10, 2002.
9. Gonzales JC. *O controle do carrapato do boi*. 2.ed. Porto Alegre: Edição do autor, 1995. 80p.
10. IICA - Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. *Técnicas para el diagnóstico de babesioses y anaplasmosis bovina*. San José: IICA, 1987. 79p.
11. Kessler RH, Madruga CR, Jesus EF, Semprebom DV. Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. *Pesq Agropec Bras* 22: 747-752, 1987.

12. Kessler RH, Schenk MAM, Madruga CR, Gomes A. Viability of a method for the isolation of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* to create a strain bank from five physiographical regions of Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 7: 91-94, 1998.
13. Linhares GFC, Massard CL, Araújo JLB, Alves L. Levantamento sorológico para *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1983) e *Babesia bovis* (Babès, 1888) em bovinos na região Centro-Oeste do Brasil. *Arq Univ Fed Rur RJ* 15: 85-91, 1992.
14. Linhares GFC, Santana AP, Lauerman HL, Madruga CR. Assessment of primers designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. *Ciência An Bras* 3: 27-32, 2002.
15. Losos GJ. *Infectious tropical diseases of domestic animals*. New York: Longman Scientific & Technical, 1986. 138p.
16. Madruga CR, Leal CRB, Ferreira AMT. et al. Genetic and antigenic analysis of *Babesia bigemina* isolates from five geographical regions of Brazil. *Pesq Vet Bras* 22: 153-160, 2002.
17. Mahoney DF & Mirre GB. A note on the transmission of *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*) by the one-host tick *Boophilus microplus*. *Res Vet Sci* 26: 253-254, 1979.
18. Mendonça CL, Vieira D, Kohayagawa A, Schenk MAM, Madruga CR, Afonso JAB. Clinical and hematological evaluation of Nelore calves experimentally infected with isolates of *Babesia bigemina* from the southeastern, northeastern and northern regions of Brazil. *Pesq Vet Bras* 23: 52-60, 2003.
19. Riek, R.F. The life cycle of *Babesia argentina* Lignière, 1903 (Sporozoa: Piroplasmidea) in the vector *Boophilus microplus*. *Aust J Agric Res* 17: 247-254, 1966.
20. Riek, R.F. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust J Agric Res* 15: 802-821, 1964.
21. Ruiz PMG, Lima JD, Passos LMF. Serological profile of *Babesia bovis* in animals submitted to premonition. *Rev Bras Parasitol Vet* 8: 45-48, 1999.
22. Santos HQ, Linhares GFC, Madruga CR. Estudo da prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de Imunofluorescência indireta e ELISA. *Ciência An Bras* 2: 133-137, 2001.
23. Thompson KC. A technique to establish a laboratory colony of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bigemina*. *Vet Parasitol* 2: 223-229, 1976.
24. Todorovic RA, Long RF. Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of *Babesia* spp. infections in Colombia cattle. *Zeitschrift Tropenmed Parasitol* 27: 169-181, 1976.