

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE UMA VACINA CONSTITUÍDA POR *Anaplasma centrale* E CEPAS ATENUADAS DE *Babesia bigemina* E *Babesia bovis* CONTRA A TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA

ODILON VIDOTTO¹
ROBERTA LEMOS FREIRE¹
ROSÂNGELA ZACHARIAS MACHADO²
MARCO ANTÔNIO DA ROCHA³
SÉRGIO SILVA DA SILVA⁴

VIDOTTO, O., FREIRE, R.L., MACHADO, R.Z., ROCHA, M.A. da, SILVA, S.S. da. Avaliação do desempenho de uma vacina constituída por *Anaplasma centrale* e cepas atenuadas de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* contra a tristeza parasitária bovina. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, v.19, n.1, p.26-30, mar. 1998.

RESUMO: Cento e trinta novilhas importadas do Uruguai foram imunizadas no Brasil com uma vacina trivalente congelada, contendo *Anaplasma centrale* e cepas atenuadas de *Babesia bigemina* e *B. bovis*. Trinta e cinco dias após a vacinação, os animais foram desafiados com cepas virulentas de *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*. No dia do desafio e 30 dias após, foram colhidas amostras de sangue de 28 animais para a avaliação de hematócrito e teste sorológico. Os animais resistiram bem ao desafio com as cepas virulentas, pela ausência de sinais clínicos da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) durante o período de observação. O teste de ELISA indireto mostrou que os animais vacinados apresentavam anticorpos contra os três agentes da TPB (*B. bigemina* - Densidade Óptica (DO) média = 0.356, *B. bovis* = 0.320 e *A. marginale* = 0.295), aumentando significativamente após o desafio (*B. bigemina* - DO média = 0.664, *B. bovis* = 0.637 e *A. marginale* = 0.549).

PALAVRAS CHAVE: Bovinos, babesiose, anaplasmoze, vacina atenuada, ELISA indireto.

1. INTRODUÇÃO

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é uma doença causada por agentes infecciosos dos gêneros *Babesia* e *Anaplasma*. No Brasil, freqüentemente estão envolvidas a *Babesia bovis* (Babes, 1888), a *Babesia bigemina* (Smith & Kilborn, 1893) e o *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910).

Embora os animais criados em países de clima tropical e subtropical são na sua maioria de raças indianas, relativamente resistentes ao carrapato e a TPB, a enfermidade adquire maior importância quando se trata de animais importados de regiões livres da doença, visando o melhoramento genético do rebanho nacional (Massard, 1990).

Diversas estratégias têm sido ensaiadas na busca de uma solução para este problema. As primeiras práticas de vacinações contra Babesiose foram realizadas na Austrália por Pound (1897) e nos E.U.A por Connaway & Francis (1899) apud Callow, (1977) os quais colheram sangue de animais infectados (doadores) e o transfundiram para animais livres (receptores). Esta técnica foi inicialmente utilizada no Brasil por Sergent et. al. (1924), denominando-a de "premunicação". Um dos principais inconvenientes que limitam o seu uso é o risco de transmissão de doenças

como é o caso da Leucose Enzoótica de etiologia a vírus (Esteban et al., 1988; Rogers et al., 1988).

Países como Austrália, EUA e Israel têm utilizado a mais tempo novos métodos de imunoprofilaxia, com bases em cepas não virulentas de *Babesia* spp e *Anaplasma* spp (Ristic & Kreier, 1981; Mahoney, 1977; Pipano et al., 1986). No Brasil, cepas de *B. bovis* e *B. bigemina* foram atenuadas no Centro Nacional Pesquisa Gado Corte da EMBRAPA de Campo Grande/MS (CNPGC-EMBRAPA) (Kessler et al., 1987), na Universidade Federal de Pelotas (UFPel) (Farias et al., 1986), na Universidade Federal de Viçosa (UFV) (Patarroyo et al., 1988) e no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor no Rio Grande do Sul (IPVDF) (Arteche, 1992) e juntamente com uma cepa Sul Africana de *A. centrale* foram incorporadas em vacinas que atualmente estão em uso a campo principalmente no Sul e Sudeste do País. No Paraná, a vacina da UFPel, inicialmente utilizada em novilhas holandesas importadas do Uruguai (dados não publicados), mostrou resultados satisfatórios, com ressalvas para Anaplasmoze, que tem ocorrido recidivas da doença quando os animais vacinados entram em contato com o carrapato. Uma avaliação mais detalhada das vacinas vivas atenuadas faz-se necessário principalmente no momento em que a sua

¹ Universidade Estadual de Londrina (UEL), Depto de Med. Vet. Preventiva, Campus Universitário, Caixa postal 6001, CEP 86051-970, Londrina, Paraná.

² UNESP - Jaboticabal

³ UEL - Depto de Zootecnia

⁴ UFPelotas

utilização é crescente no País. Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram os de avaliar os níveis de anticorpos existentes em soros de um lote de animais vacinados e depois desafiados artificialmente com cepas virulentas dos três agentes da TPB, bem como observar o comportamento clínico destes animais frente ao desafio com cepas virulentas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Um lote de 130 novilhas da raça holandesa, importadas do Uruguai, foram vacinados no Rio Grande do Sul com dois inóculos de 2 ml, com intervalo de 35 dias, de uma vacina tríplice constituída de *A. centrale* e cepas atenuadas de *B. bigemina* e *B. bovis* (UFPel), mantida em nitrogênio líquido. Cada dose da vacina, administrada via intramuscular, continha aproximadamente 10^7 hemácias parasitadas de cada um dos agentes infecciosos da TPB. As cepas de *B. bovis* e *B. bigemina* foram atenuadas no ano de 1991, de acordo com o método australiano descrito por Callow & Mellors (1966). A cepa de *A. centrale* (Theiler, 1911) utilizada é originária da África do Sul e tem sido mantida até os dias atuais através de reinoculações em animais esplenectomizados e criopreservação. Após a segunda dose da vacina os animais foram mantidos estabulados em observação por mais 35 dias e depois transportados para um quarentenário, no município de Miraselva, na região norte do estado do Paraná.

Oitenta dias após terem recebido a primeira dose da vacina, os animais foram desafiados, via intramuscular, com inóculo de 2 ml de uma suspensão contendo 10^6 hemácias parasitadas de cada uma das cepas virulentas de *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*, isoladas no Rio Grande do Sul (Farias et al., 1986). Durante o período de observação os animais foram mantidos a pasto, com aplicação de carrapaticida a base de piretróide a cada 14 dias.

No dia do desafio e 30 dias após, foram colhidas amostras de sangue ao acaso de 28 animais para sorologia e avaliação do hematócrito. Neste período, os animais foram observados diariamente e aqueles que apresentavam sinais clínicos sugestivos da TPB foram separados do lote, recolhidos ao curral e após avaliação com exames clínicos e laboratoriais rotineiros (temperatura retal, hematócrito e esfregaço de sangue corados pelo método de Giemsa, com identificação do agente infeccioso envolvido), efetuou-se o tratamento específico.

As amostras de soros foram analisadas pelo teste de ELISA indireto de acordo com a técnica descrita por Machado (1991). A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro para ELISA, com filtro de 405 nm. Os antígenos utilizados neste experimento foram purificados segundo a técnica preconizada por Machado (1991), a partir de isolados de *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* de Jaboticabal. As "Densidades Ópticas" (DO) dos soros negativos e positivos, usados como controle, eram, respectivamente: *B. bigemina* -

0.085/0.581, *B. bovis* - 0.037/0.572 e *A. marginale* - 0.069/0.559. Considerou-se como positivos os soros que apresentaram DO duas vezes e meia acima das DO dos controles negativos.

As médias das Densidades Ópticas (DO) obtidas pelo teste de ELISA foram submetidos à análise estatística utilizando-se o teste t de Student segundo Euclides (1983).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 130 animais vacinados e desafiados com cepas virulentas dos três agentes da TPB, apenas três apresentaram sinais mais acentuados da doença, com temperaturas retais de 40,3 a 40,8 °C e anorexia, identificando-se nas lâminas coradas pelo Giemsa, a presença de *A. marginale* com 4,8 a 5,7 % de hemácias parasitadas. Estes animais foram tratados com tetraciclina e apresentaram recuperação clínica e redução da parasitemia em 48 horas.

As médias de 25,5% e 24,6% dos hematócritos dos 28 animais examinados, respectivamente, aos 40 dias após a vacinação e 30 dias após o desafio, não servem de parâmetros para avaliar o efeito imediato da multiplicação dos parasitas sobre as hemácias. No entanto, estes valores são indicativos da capacidade do sistema hematopoiético dos animais em repor as células destruídas nas fases de multiplicação das cepas vacinais e virulentas dos agentes inoculados. Os índices relativamente baixos de hematócritos encontrados quando comparados aos valores normais da espécie, em parte, podem ser atribuídos à pobre dieta alimentar que os animais eram submetidos e, em parte à multiplicação dos agentes da TPB.

Reduções no hematócrito de animais vacinados com cepas atenuadas de *Babesia* sp e com *A. centrale* ou *A. marginale*, também foram constatadas por outros autores (Anziani et al., 1987; Kuttler e Zaugg, 1988; Schenk et al., 1993), sendo que na maioria dos casos houve recuperação dos animais sem a necessidade de intervenção terapêutica. Anziani et al. (1987) verificaram uma queda de 9,6%, na média dos hematócritos de novilhas holandesas, 45 dias após vacinação com *A. centrale* e apenas redução moderada após o desafio com *A. marginale*. Estes autores afirmam, no caso de novilhas jovens, que a inoculação com *A. centrale* produziu reações leves ou moderadas e embora não tenha prevenido a infecção subsequente de *A. marginale*, reduziu a severidade da infecção por esta última espécie. Schenk et al. (1993) realizaram um teste crítico de uma vacina constituída por *A. centrale* e cepas atenuadas de *B. bigemina* e *B. bovis* utilizando bovinos da raça Brangus, na faixa etária de 8 a 12 meses. Na fase vacinal houve um caso de babesiose com elevação de temperatura, queda acentuada do hematócrito e parasitemia de 4,2% por *B. bigemina*. Na fase de desafio ocorreram dois casos clínicos por *B. bovis*, um por *B. bigemina* e três por *A. marginale*. Todos animais se recuperaram com exceção

de um que morreu com 24% de parasitemia por *A. marginale*. A taxa de inocuidade da vacina foi de 99% para *B. bigemina* e 100% para *B. bovis* e *A. centrale* e a taxa de proteção foi de 98% para *B. bigemina* e *B. bovis* e 95% para *A. marginale*. No nosso trabalho não foi possível calcular a taxa de inocuidade da vacina, mas pelo desafio artificial, a taxa de proteção conferida foi de 100 % para *B. bigemina* e *B. bovis* (ausência de casos clínicos de babesiose) e 98% para *A. marginale* (três casos clínicos).

A Tabela 1 mostra os níveis de anticorpos séricos dos animais em DO, pelo teste de ELISA indireto, após serem tabulados e submetidos à análise estatística. Quando as DO médias de soros, colhidos 30 dias após a segunda dose da vacina foram confrontadas com as DO médias obtidas de soros colhidos após o desafio, constatou-se, para os três agentes, uma diferença significativa ($P < 0.01\%$). As DO médias obtidas após a vacinação para os três agentes, mostravam níveis

razoáveis de anticorpos, ainda que tenham ocorrido variações individuais consideráveis entre os níveis máximos e mínimos de anticorpos. No entanto, estes níveis aumentaram significativamente após o desafio artificial com as cepas virulentas, evidenciando um aumento da imunidade, que se traduziu numa maior resistência quando os animais foram desafiados a campo com altas infestações de carrapato (dados não publicados). As frequências das DO agrupadas em seis classes de grandeza, para os três agentes da TPB (Tabela 2), mostram nitidamente que o número de animais com níveis de anticorpos séricos mais elevados aumentou substancialmente após o desafio artificial com as cepas virulentas.

Com base nas informações apresentadas neste trabalho podemos concluir que a vacina utilizada proporcionou proteção satisfatória aos animais e o desafio artificial aumentou a imunidade conferida.

Tabela 1. Densidades Ópticas (DO), médias aritméticas (X), erro padrão (EP) e coeficiente de variação (CV) dos soros de novilhas holandesas Preto e Branco (HPB) importadas do Uruguai vacinadas com *Anaplasma centrale* e cepas atenuadas de *Babesia bigemina* e *B. bovis*, posteriormente desafiadas com cepas virulentas de *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*.

Espécies	Condição	N	X	EP	CV (%)	DO mínima	DO máxima
<i>B. bigemina</i>	AV	28	0.356 ± 0,023 ^b		30,71	0.172	0.638
	AD	28	0.664 ± 0,038 ^a		30,55	0.191	0.952
<i>B. bovis</i>	AV	28	0.320 ± 0,026 ^b		42,81	0.108	0.610
	AD	28	0.637 ± 0,040 ^a		33,28	0.220	1.117
<i>A. marginale</i>	AV	28	0.295 ± 0,022 ^b		38,64	0.146	0.546
	AD	28	0.549 ± 0,027 ^a		26,05	0.280	0.806

AV = Após vacinação ; AD = Após desafio; N = Número de animais
As médias pertencentes a mesma espécie (AV ou AD) seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste "t" ($P < 0,01$).

Tabela 2. Distribuição das Densidades Ópticas (DO) obtidas pelo teste de ELISA indireto, em soros de novilhas holandesas Preto e Branco (HPB) importadas do Uruguai vacinadas e desafiadas com os agentes da Tristeza Parasitária Bovina (TPB), em função de suas grandezas.

<i>B. bigemina</i> após vacina (AV)				<i>B. bigemina</i> após desafio (AD)			
Classes	DO mínima	DO máxima	Frequência	Classes	DO mínima	DO máxima	Frequência
1	0.172	0.249	8	1	0.191	0.318	3
2	0.249	0.327	4	2	0.318	0.445	2
3	0.327	0.405	8	3	0.445	0.571	3
4	0.405	0.483	4	4	0.571	0.698	7
5	0.483	0.560	2	5	0.698	0.825	6
6	0.560	0.638	2	6	0.825	0.952	6
<i>B. bovis</i> após vacina (AV)				<i>B. bovis</i> após desafio (AD)			
1	0.108	0.192	5	1	0.220	0.369	2
2	0.192	0.275	9	2	0.369	0.519	6
3	0.275	0.359	3	3	0.519	0.668	8
4	0.359	0.443	4	4	0.668	0.818	6
5	0.443	0.526	5	5	0.818	0.967	5
6	0.526	0.610	2	6	0.967	1.117	1
<i>A. marginale</i> após vacina (AV)				<i>A. marginale</i> após desafio (AD)			
1	0.146	0.213	9	1	0.280	0.368	4
2	0.213	0.279	6	2	0.368	0.455	3
3	0.279	0.346	4	3	0.455	0.543	6
4	0.346	0.413	4	4	0.543	0.631	6
5	0.413	0.479	2	5	0.631	0.718	6
6	0.479	0.546	3	6	0.718	0.806	3

AV = Após Vacinação; AD = Após Desafio

VIDOTTO, OL, FREIRE, R.L., MACHADO, R.Z., ROCHA, M.A. da, SILVA, S.S. da. Performance of a vaccine containing *Anaplasma centrale* and attenuated strains of *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* against bovine babesioses and anaplasmosis. *Semina: Ci. Agr.*, Londrina, v.19, n.1, p.26-30, mar. 1998.

ABSTRACT: One hundred and thirty adult cattle imported from a tick-free region (Uruguay) were immunized in Brazil with a frozen trivalent vaccine containing *Anaplasma centrale* and attenuated *Babesia bigemina* and *B. bovis*. Thirty five days after the second dose of the vaccine, the animals were challenged with virulent strains of the haemoparasites. At the day and 30 days after the challenge, it was taken serum samples from 28 animals, in order to evaluate the packed cell volume (PCV) and for serological tests. The results indicated that the animals resisted well the challenge with the virulent strains as showed by the absence of severe clinical symptoms during the observation period. The indirect ELISA test revealed serum antibodies against the three infectious agents (*B. bigemina* - Overall Optical Density (OD) = 0.356, *B. bovis* = 0.320 and *A. marginale* = 0.295) in vaccinated animals, which raised significantly after challenging with virulent strains (*B. bigemina* - Overall OD = 0.664, *B. bovis* = 0.637 and *A. marginale* = 0.549).

KEY WORDS: Cattle, babesiosis, anaplasmosis, attenuated vaccine, indirect ELISA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANZIANI, O. S., TARABLA, H. D., FORD, C. A., GALLETTO, C. Vaccination with *Anaplasma centrale*: response after an experimental challenge with *Anaplasma marginale*. *Trop. Anim. Health. Prod.*, v.19, p.83-87, 1987.
- ARTECHE, C. C. P. Imunoprofilaxia da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) no Brasil. Uso de cepas atenuadas de *Babesia* spp e de cepa heteróloga de *Anaplasma*. *Horiz. Vet.*, v.66, p.39-41, 1992.
- CALLOW, L.L., MELLORS, L. T. A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomised calves. *Aust. Vet. J.*, v.42, p.464-465, 1966.
- CALLOW, L.L. Vaccination against bovine babesiosis. *Adv. Med. Biol.*, v.93, p.121-129, 1977.
- ESTEBAN, E.N., SANZ, M.E., GONGORZA, L.M. Premunización para "tristeza" y difusión de la Leucemia Bovina. *Vet. Arg.*, v.5, n.44, p. 306, 1988.
- EUCLIDES, R. F. Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas). Viçosa : Imprensa Universitária, Univ. Fed. Viçosa (MG), 1983. 59p.

- FARIAS, N.A. CARVALHO, P.A., HELFWIG, S.L., ARNONI, J.V., CRUZ, H.S., SILVA, S.S., OLIVE LEITE, A.M. Isolamento de cepas de *B. bigemina* e *B. bovis* através de infestação de *Boophilus microplus* em terneiros esplenectomizados. In: ENCONTRO DE PESQUISA VETERINÁRIA, 11., 1986, Pelotas. *Anais...* Pelotas, 1986. 39 p.
- KESSLER, R. H., SACCO, A. M. S., JESUS, E. F., MADRUGA, C. R. Desenvolvimento de cepas vivas atenuadas de *Babesia bovis* e *B. bigemina*: Teste preliminar. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 22 (11/12); p. 1225-1230, 1987.
- KUTTLER, K. L., ZAUGG, J. L. Characteristics of an attenuated *Anaplasma marginale* of deer origin as an anaplasmosis vaccine. *Trop. Anim. Health. Prod.*, v. 20, p. 85-91, 1988.
- MACHADO, R. Z. *Estudo de imunidade celular e humoral na babesiose bovina*. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP, 1991. 151p. (Tese de Livre-Docência).
- MAHONEY, D. F. Babesia of domestic animals. In: KREIER, J. P. *Parasitic Protozoa*. New York, Academic Press, 1977. v.4, p. 1-52.
- MASSARD, L.C. Sanidade animal: Tristeza Parasitária dos Bovinos. *Hora Vet.*, n.54, p.10-13, 1990.
- PATARROYO, J. H., PRATES, A. A., RIBEIRO, M. F. B., SANTOS, J. L., FARAIS, J. E. Atenuação de uma amostra de *Babesia bovis* para uso como vacina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 21, Salvador. *Anais...* Salvador, 1988.
- PIPANO, E., KRIGEL, Y., MEIRA, F., MARKOVICS, A., MAYER, E. FROZEN *Anaplasma centrale* vaccine against anaplasmosis in cattle. *Brit. Vet. J.*, v. 142, p. 553-556, 1986.
- RISTIC, M., KRIER, J. P. *Babesiosis*. New York: Academic Press, 1981.
- ROGERS, R., DIMMOCK, K.C., de VOS, J.A., RODWELL, J.B. Bovine leucosis contamination of a vaccine produced in vivo against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Australian Vet. Jour.*, v.65, n.9, p.285-287, 1988.
- SERGENT, E., PARROT, L., DONATIENA, A. Use question de terminologie: immunizer et premunir. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, Paris, v.17, p.37, 1924.
- SCHENK, M.A. M., KESSLER, R. H., MIGUITA, M., HONER M. R. Desenvolvimento de cepas atenuadas de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma centrale*: III. Teste crítico com bovinos Brangus. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.2, n.2, p.75-78, 1993.