

ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Babesia bovis* E ANTI-*Babesia bigemina* EM BOVINOS DE LEITE DA MICRORREGIÃO DE GOIÂNIA DETERMINADA PELOS TESTES DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA E ELISA

HÉLVIO QUEIRÓZ DOS SANTOS¹, GUIDO FONTGALLAND COELHO LINHARES² E CLÁUDIO ROBERTO MADRUGA³

1. Professor do Centro de Ciências Agrárias - Campus Avançado UFG - Jataí/GO
2. Professor do Departamento de Medicina Veterinária/EV - UFG. Caixa Postal 131 - 74001-970 - Goiânia-GO
3. Pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte. CNPGC/EMBRAPA. Campo Grande-MS.

RESUMO

O trabalho teve por objetivo estudar a prevalência de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e anti-*Babesia bovis* no rebanho bovino de leite da microrregião de Goiânia por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ELISA. Para o delineamento experimental o mapa da microrregião foi dividido em 47 quadrantes, dos quais 25 foram sorteados para a colheita de material. Em cada propriedade visitada foi colhido sangue aleatoriamente em cerca de 10% dos animais. Colheram-se 180 amostras de sangue, número estatisticamente representativo para a população bovina em estudo. Do total das amostras, 94,4% e 93,3% foram positivas para *Babesia bigemina* ao teste de

RIFI e ELISA respectivamente, sendo que os métodos apresentaram uma concordância de 97,8%. Para *Babesia bovis*, 100% das amostras foram positivas pela RIFI e 98,9% pelo ELISA, com uma concordância de 98,9% entre eles. Não foi constatada nenhuma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre as provas de RIFI e ELISA. A microrregião de Goiânia pôde ser caracterizada como uma área de estabilidade enzoótica para babesiose bovina causada tanto por *B. bigemina* quanto por *B. bovis*, portanto oferece risco em potencial de perdas econômicas na introdução de animais suscetíveis procedentes de regiões livres.

PALAVRAS-CHAVE: Babesiose, bovinos, reação de imunofluorescência indireta, ELISA, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*.

ABSTRACT

STUDIES ON THE PREVALENCE OF ANTIBODIES AGAINST *Babesia bigemina* AND *Babesia bovis* IN DAIRY CATTLE IN THE MICROREGION OF GOIÂNIA BY THE INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TEST AND ELISA.

This research was performed to study the prevalence of antibodies against *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in dairy cattle of the microregion of Goiânia by the indirect fluorescent antibody test (IFAT) and ELISA. For the experimental design of the study, the map of the microregion was divided into 47 squares, from which 25 were randomly selected to be visited for blood sample collections. Blood was collected from 10% of the animals in each property. The total sera sample was 180 as determined by mathematical model. The results showed a very high

prevalence of *B. bovis* by ELISA (98,9%) and IFAT (100%). The prevalence for *B. bigemina* was even high with 94,4% and 93,3% by IFAT and ELISA, respectively. The results did not show any significant statistical difference ($P < 0,05$) and demonstrated an agreement between the two methods. The results of this study allowed the characterization of the region as a stable area for *B. bovis* and *B. bigemina*, which indicated a potential risk of economic losses for trade cattle introduced from non enzootic areas.

KEYWORDS: Babesiosis, cattle, indirect fluorescent antibody test, ELISA, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*.

INTRODUÇÃO

Babesia bovis e *Babesia bigemina* são protozoários hemoparasitos, da ordem Piroplasmorida, família Babesiidae (Levine, 1988), agentes de importante enfermidade em bovinos, conhecida como babesiose. Esta doença causa graves prejuízos econômicos para a bovinocultura, observados sob a forma de mortalidade, gastos com medicamentos, diminuição na produção de leite e carne, atraso no ritmo de crescimento dos bezerros e gasto com vacinações ou premunicação (Massard & Freire, 1985).

A transmissão é feita normalmente por carrapatos, vetores biológicos, sendo que o *Boophilus microplus* é o vetor que ocorre nas Américas (Friedhoff, 1988).

O Brasil é reconhecido como um país enzoótico, no entanto, existem algumas regiões que, em função de suas condições edafoclimáticas, não favorecem o desenvolvimento do *B. microplus* durante todo o ano e, dessa forma, de acordo com conceitos de Mahoney & Ross (1972), podem ser consideradas regiões de instabilidade enzoótica. É conhecido, com base nestes conceitos, que as maiores perdas econômicas referentes à babesiose bovina ocorrem em áreas de instabilidade enzoótica ou por ocasião da transferência de animais destas, ou de áreas livres, para outras cuja situação epidemiológica seja de estabilidade. Estudos epidemiológicos realizados no Brasil têm caracterizado determinadas regiões como áreas de estabilidade enzoótica, com prevalências sorológicas acima de 80%, para *B. bovis* (Linhares et al., 1992; Barci et al., 1995; Araújo et al., 1997; Araújo et al., 1998; Soares et al., 2000; Madruga et al., 2000a) e para *B. bigemina* (Alves, 1987; Linhares et al., 1992; Artiles et al., 1995; Barci et al., 1995; Araújo et al., 1997; Madruga et al., 2000a), assim como regiões de instabilidade para *B. bovis* (Alves, 1987; Artiles et al., 1995; Martins et al., 1995; Vidotto et al., 1997; Lima et al., 1999) e para *B. bigemina* (Vidotto et al., 1997).

Entre outras provas sorológicas, a RIFI e o ELISA são as mais utilizadas para estudos epidemiológicos desta enfermidade. A concordância dos resultados destes dois métodos tem sido comprovada através de pesquisas científicas (Martins et

al., 1996; Araújo et al., 1998; Madruga et al., 2000b).

Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de estudo sorológico de rebanho para a caracterização da situação epidemiológica da babesiose bovina por *B. bovis* e *B. bigemina* no rebanho leiteiro da microrregião de Goiânia e, paralelamente, avaliar a correlação entre as técnicas de RIFI e ELISA, aplicadas para esta finalidade.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na microrregião de Goiânia, que ocupa uma área de 6.847,9 Km², situada em região de cerrado do Estado de Goiás. Apresenta altitude variando de 707 a 1.030 metros e localiza-se entre as latitudes 16° 23' e 16° 58' e as longitudes 48° 57' e 49° 31'. Apresenta clima tropical com duas estações bem definidas, ou seja, verão chuvoso e inverno seco, com mínimas inferiores a 11 mm (IBGE, 1994). Possui um rebanho aproximado de 565.710 (Seplan, 1999).

O mapa da microrregião de Goiânia foi dividido em 47 quadrantes de 225 Km². Posteriormente, foi realizado um sorteio de 25 quadrantes, correspondendo a mais de 50% do total da área abrangida pelo estudo (Alves, 1987). Para cada quadrante sorteado foi escolhida uma propriedade de acordo com a disponibilidade de acesso ao produtor. Foram colhidas amostras de sangue, ao acaso, em bovinos com idade acima de um ano, em aproximadamente 10% do total de animais de cada propriedade.

O tamanho da amostra utilizada neste estudo foi de 180 soros, número calculado de acordo com o Centro Pan-Americano de Zoonoses (1973), portanto considerado representativo para a população de bovinos da microrregião de Goiânia. Para o cálculo, o valor utilizado como prevalência esperada foi de 98%, obtido a partir de um pré-experimento realizado com 100 amostras de soros colhidas aleatoriamente em bovinos da região. O grau de confiança adotado foi de 95% e a margem de erro admitida de 5%.

A colheita foi realizada nos meses de fevereiro e março de 1999. Obtiveram-se 10 ml de sangue por punção da veia jugular em tubos de vidro, utili-

zando-se agulhas 40x16 mm. Após a completa coagulação sanguínea, as amostras foram centrifugadas para a separação dos soros, sendo estes distribuídos em alíquotas de 3 ml, em unidades plásticas (tubos tipo Eppendorf) e congelados a -70° C em ultrafreezer, para posterior utilização nas provas sorológicas.

Os antígenos de *B. bigemina* e *B. bovis*, utilizados no teste de RIFI e ELISA, foram obtidos conforme Madruga et al. (1986). Os testes sorológicos foram realizados nos laboratórios do Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte - EMBRAPA, conforme técnica descrita por Madruga et al. (1986) para a RIFI e Araújo et al. (1997) para o ELISA.

A leitura dos resultados do teste de ELISA foi realizada por espectrofotometria, com filtro de 405 nm, em um leitor de ELISA. O *cut-off* foi determinado para cada placa e a classificação dos soros em positivos e negativos baseou-se na densidade óptica fornecida pelo leitor.

Para a execução da prova de RIFI utilizou-se o conjugado anti-IgG bovina com isotiocianato de

fluoresceína. A titulação prévia do conjugado foi determinada em 1:320. As amostras de soro foram testadas nas diluições de 1:320 e 1:640 e a leitura dos resultados foi realizada em microscópio de epifluorescência, com aumento de 400X.

Para a avaliação da correlação entre os resultados obtidos pelas provas sorológicas de RIFI e ELISA, foi utilizado o método de qui-quadrado segundo Siegel (1979). A concordância entre os dois testes foi definida conforme Mathias & MacMillan (1995).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das provas sorológicas realizadas para a pesquisa de anticorpos anti-*B. bovis*, em 180 amostras de soros de bovinos da microrregião de Goiânia, demonstraram 178 (98,9%) positivas ao teste de ELISA e 180 (100%) positivas pela RIFI. Com relação à *B. bigemina*, 168 amostras (93,3%) foram positivas pelo ELISA e 170 (94,4%) pela RIFI (Tabela 1).

TABELA 1. Frequência relativa e absoluta de bovinos de leite positivos à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ao ELISA na pesquisa de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e anti-*Babesia bovis*, na microrregião de Goiânia.

	Nº Amostras	RIFI		ELISA	
		Positivas	(%)	Positivas	(%)
<i>B. bigemina</i>	180	170	94,4	168	93,3
<i>B. bovis</i>	180	180	100,00	178	98,9

Os rebanhos de todas as 25 propriedades rurais visitadas (100%) foram positivos aos testes de ELISA e de RIFI, tanto para *B. bigemina* quanto para *B. bovis*.

De acordo com os conceitos epidemiológicos propostos por Mahoney & Ross (1972), as altas taxas de prevalência sorológica para *B. bovis* e para *B. bigemina* verificadas neste trabalho permitem a conclusão de que a microrregião de Goiânia

se caracteriza como uma área de elevada estabilidade enzoótica para a babesiose bovina. Desta forma, considera-se mínimo o risco de surtos com perdas econômicas em rebanhos nativos ou adaptados, no entanto a região pode ser caracterizada como uma área de risco para animais suscetíveis procedentes de regiões livres ou de instabilidade enzoótica, os quais devem ser previamente submetidos a um processo de imunização.

Estes resultados reafirmam aqueles publicados por Linhares et al. (1992), que verificaram uma prevalência de 98,72% para *B. bovis* e de 97,45% para *B. bigemina* no município de Goiânia, que compõe, juntamente com outros 14 municípios, a microrregião de Goiânia. Conclui-se que a situação epidemiológica para o município mantém-se a mesma nos últimos oito anos.

A situação de estabilidade enzoótica observada para a microrregião de Goiânia se assemelha com aquela registrada para outras regiões do Brasil, com relação à *B. bovis* (Barci et al., 1995; Araújo et al., 1997; Araújo et al., 1998; Soares et al., 2000; Madruga et al., 2000a) e *B. bigemina* (Alves, 1987; Artiles et al., 1995; Barci et al., 1995; Araújo et al., 1997; Madruga et al., 2000a), distinguindo-se, no entanto, da condição de instabilidade enzoótica apontada para outras regiões referente a *B. bovis* (Alves, 1987; Artiles et al., 1995; Martins et al., 1995; Vidotto et al., 1997; Lima et al., 1999) e *B. bigemina* (Vidotto et al., 1997).

De acordo com Mahoney & Ross (1972) e Young (1988), as diferenças nas taxas de prevalência encontradas nas diversas regiões ocorrem, principalmente, em função das condições climáticas e edáficas próprias de cada região, que atuam como fatores determinantes de pressão sobre as populações de carrapatos e, dessa forma, condicionam características epidemiológicas locais.

Através dos tratamentos estatísticos empregados, verificou-se que os resultados encontrados pelas provas de RIFI e ELISA não demonstraram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) e que ambas apresentaram uma concordância de 98,9% na detecção de anticorpos anti-*B. bovis* e 97,8% para anticorpos anti-*B. bigemina*. A concordância entre os métodos de RIFI e ELISA observada neste trabalho sustenta os resultados reportados por Martins et al. (1996), Araújo et al. (1998) e Madruga et al. (2000b).

REFERÊNCIAS

ALVES, L. C. *Prevalência da babesiose bovina em gado leiteiro no município de Garanhuns, Estado de Pernambuco*. São Paulo, 1987. 123f. Dis-

sertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; ALMEIDA, M. A. O.; LEAL, C. R. B.; MIGUITA, M. Levantamento sorológico de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* no Estado de Bahia pela imunofluorescência indireta e teste de congutinação rápida. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 6 n. 2, p. 111-115, 1997.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; LEAL, C. R. B.; SCHENK, M. A. M.; KESSLER, R. H.; MARQUES, A. P. C.; LEMAIRE, D. C. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid congutination tests in detecting antibodies against *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.*, v. 74, n. 2-4, p. 101-108, 1998.

ARTILES, J.; ALVES-BRANCO, P. J. F.; MARTINS, J. R.; CORREA, L. B.; SAPPER, M. F. M. Prevalência de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* no município de Bagé, Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 4, n. 2, supl. 1, 1995.

BARCI, L. A. G.; OLIVEIRA, M. R.; MACHADO, R. Z.; OLIVEIRA, D. A.; ARAUJO FILHO, R. S. Epidemiologia da babesiose bovina no Estado de São Paulo: I. Estudo em rebanhos produtores de leite tipo B do município de Pindamonhangaba, Vale do Paraíba. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 3, n. 2, p. 79-82, 1995.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Zoneamento ecológico e econômico da área do aglomerado de Goiânia*. Goiânia, 1994.

BRASIL. Secretaria do Planejamento e Desenvolvimento Regional. Superintendência de Estatística, Pesquisa e Informação. *Anuário Estatístico do Estado de Goiás*. 1999. 621p.

- CENTRO PAN-AMERICANO DE ZOONOSES. *Procedimentos para estudios de prevalência de enfermidades crônicas en el ganado*. Buenos Aires, 1973. 31p. (Nota Técnica nº 18).
- FRIEDHOFF, K. T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. *Babesiosis of domestic animals and man*. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 23-52.
- LEVINE, N. D. Progress in Taxonomy of the Apicomplexan Protozoa. *J. Protozoology*. v. 35, n. 4, nov. 1988.
- LIMA, F. V. A.; MOLNAR, E.; MOLNAR, L.; SILVA, C. M. S.; LIMA, F. V. A. Seroepidemiological study of bovine babesiosis (*Babesia bovis*) by indirect ELISA test in the State of Para, Brazil. *Rev. Ciências Agrárias*, v. 32, p. 55-64, 1999.
- LINHARES, G. F. C.; MASSARD, C. L.; ARAÚJO, J. L. DE B.; ALVES, L. C. Levantamento sorológico para *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) e *Babesia bovis* (Babes, 1888) em bovinos na Região Centro-Oeste do Brasil. *Arq. Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro*, v. 15, n. 1, p. 85-91, 1992.
- MADRUGA, C. R.; KESSLER, R. H.; JESUS, E. F.; SETE, A. J. *Imunofluorescência indireta para diagnóstico sorológico de Babesia bovis e Babesia bigemina*: produção de antígeno com cepas isoladas no Estado de Mato Grosso do Sul e avaliação preliminar do teste. Campo Grande: EMBRAPA-CNPQC, 1986, 6p. (Pesquisa em Andamento, 32).
- MADRUGA, C. R.; BRAGA, M. M.; OLIVEIRA, D. B.; MASSARD, C. L.; SOARES, C. O.; OLIVEIRA, D. B. Prevalence of antibodies against *Babesia bovis* (Babes, 1888) and *B. bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) (Apicomplexa: Babesiidae) in cattle from four municipalities of Rio de Janeiro State. *Rev. Bras. Cien. Vet.*, v.7, n. 2, p. 113-116, 2000a.
- MADRUGA, C. R.; MARQUES, A. P. C.; LEAL, C. R. B.; CARVALHO, C. M. E.; ARAUJO, F. R.; KESSLER, R. H. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 20, n. 3, p. 109-112, 2000b.
- MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.*, v. 48, p. 292-298, 1972.
- MARTINS, J. R.; CORREA, B. L.; CERESER, V. H.; ARTECHE, C. C. P.; GUGLIELMONE, A. A. Some aspects of the epidemiology of *Babesia bovis* in Santana do Livramento, Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 3, n. 2, p. 75-78, 1995.
- MARTINS, J. R.; CORREA, B. L.; CERESER, V. H. A comparative study between ELISA and indirect immunofluorescent tests to detect antibodies against *Babesia bovis*. *Ciência Rural*, v. 26, n. 1, p. 115-118, 1996.
- MASSARD, C. L.; FREIRE, R. B. Etiologia, manifestações e diagnósticos das babesioses no Brasil. *A Hora Vet.*, ano 4, n. 23, jan./fev. 1985.
- MATHIAS, L. A.; MacMILLAN, A. P. Comparação de conjugados no teste imunoenzimático competitivo para o diagnóstico sorológico da brucelose bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 15, n. 4, p. 101-105, 1995.
- SIEGEL, S. *Estatística não parimétrica para ciências do comportamento*. 1 ed. Recife: MacGraw-Hill do Brasil, 1979, 350p.
- SOARES, C. O.; SOUZA, J. C. P.; MADRUGA, C. R.; MADUREIRA, R. C.; MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Seroprevalence of *Babesia bovis* in cattle in the Norte Fluminense region. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 20, n. 2, p. 75-79, 2000.
- VIDOTTO, O.; ANDRADE, G. M.; AMARAL, C. S. H.; BARBOSA, C. S.; FREIRE, R. L.; ROCHA, M. A.; VIDOTTO, M. C. Frequência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da região de Londrina, Paraná. *Arq. Bras. Vet. Zoot.*, v. 49, n. 5, p. 655-659, 1997.
- YOUNG, A. S. Epidemiology of babesiosis. In: RISTIC, M. *Babesiosis of domestic animals and man*. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 81-98.