

Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Pará¹

Jenevaldo B. Silva^{2*}, Cinthia T. A. Lopes³, Cleyton P. Pinheiro³, Danilo H.S. Lima³, Roberto S. L. Silva³, Aivaldo H. Fonseca⁴, Flávio R. Araújo⁵ e José D. Barbosa-Neto³

ABSTRACT- Silva J.B., Lopes C.T.A., Pinheiro C.P., Lima D.H.S., Silva R.S.L., Fonseca A.H., Araújo F.R. & Barbosa-Neto J.D. 2013. [Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) on Marajo Island, State of Pará, Brazil.] Prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos (*Bubalus bubalis*) na Ilha de Marajó, Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(7):847-850. Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail: jenevaldo@hotmail.com

The aim of the study was to estimate the prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes of the Marajó Island, State of Pará, Brazil. We used an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA), with total antigen containing proteins outer surface, and polymerase chain reaction (qPCR), involving the use of SYBR Green based on amplification of a small fragment of the cytochrome b gene. The prevalence of positive animals in iELISA to *B. bovis*, *B. bigemina* and mixed infection was 24.87% (199/800), 20.75% (166/800) and 18.75% (150/800), respectively. Using the PCR, the presence of *B. bovis* was detected in 15% (18/199) and *B. bigemina* in 16% (19/199) of animals, and of these, 58% (11/19) presented co-infected by the two agents. The results show a low prevalence of antibodies anti-*B. bovis* and anti-*B. bigemina* in water buffaloes from Marajó Island. However, it was observed that the agents of bovine babesiosis circulate in buffaloes, and these may act as reservoirs.

INDEX TERMS: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, buffaloes, *Bubalus bubalis*, ELISA, qPCR, Marajó Island.

RESUMO.- O objetivo do estudo foi testar a prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em búfalos da Ilha de Marajó, Pará. Foi utilizado ensaio de imunoadsorção enzimático indireto (iELISA) com antígeno total contendo proteínas de superfície externa e reação em cadeia da polimerase (qPCR), envolvendo o uso de SYBR

Green com base na amplificação de um pequeno fragmento de gene do citocromo b. A prevalência de animais positivos no ELISA para *B. bovis*, *B. bigemina* e para infecção mista foi de 24.87% (199/800), 20.75% (166/800) e 18.75% (150/800), respectivamente. Na PCR foi detectado a presença de *B. bovis* em 15% (18/199) e de *B. bigemina* em 16% (19/199) dos animais, sendo que destes, 58% (11/19) apresentavam-se co-infectados pelos dois agentes. Os resultados mostram uma baixa prevalência de anticorpos anti-*B. bovis* e anti-*B. bigemina* em búfalos da Ilha do Marajó. Porém, observou-se que os agentes da babesiose bovina circulam em búfalos, podendo estes atuar como reservatórios.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, búfalos, *Bubalus bubalis*, ELISA, qPCR, Ilha de Marajó.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho de búfalos do ocidente e aproximadamente um terço do rebanho nacional encontra-

¹ Recebido em 2 de outubro de 2012.

Aceito para publicação em 29 de abril de 2013.

² Laboratório de Imunodiagnóstico, Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brasil. *Autor para correspondência: jenevaldo@hotmail.com

³ Universidade Federal do Pará, Instituto de Medicina Veterinária, Via de Acesso BR 316, Km 62, Bairro Saudade (atrás do Instituto Federal do Pará (IFPA)), Castanhal, PA 68740-970, Brasil. E-mail: diomedes@ufpa.br

⁴ Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ23890-000, Brasil. E-mail: adivaldo@ufrj.br

⁵ Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262 Km 4, Campo Grande, MS79002-970, Brasil. E-mail: flabio@cnpgc.embrapa.br

RESULTADOS

Os valores médios e desvios padrões da densidade óptica dos controles negativos e positivos para *Babesia bovis* foi 0.127 ± 0.01 e 1.026 ± 0.04 e para *Babesia bigemina* foi 0.121 ± 0.01 e 1.008 ± 0.06 , respectivamente. A classificação dos soros em níveis de ELISA (NE) está representada no Quadro 1.

Entre as amostras avaliadas simultaneamente por ELISA e PCR, observou-se que a positividade foi de 20% no ELISA e 15% na PCR e que apenas 5% das amostras foram positivas no ELISA e na PCR. Esses resultados demonstram que apenas 33% das amostras positivas na PCR foram diagnosticadas como positivas no ELISA. Porém, quando somado as amostras positivas dos dois testes, observou-se que 35% das amostras foram positivas, demonstrando um acréscimo na sensibilidade, o que aumentou as chances de diagnóstico positivo (Quadro 2).

A soroprevalência para *B. bovis* foi de 24.87% (199/800) e para *B. bigemina* 20.75% (166/800). Entre os animais soropositivos, 22.79% (49/215) possuíam anticorpos apenas anti-*B. bovis* e, 7.44% (16/215) apenas para *B. bigemina* e 69.76% (150/215) possuíam anticorpos circulantes contra os dois agentes (Quadro 3). Pela PCR foi detectado a presença de *B. bovis* em 15% (18/200) de *B. bigemina* em 16% (19/200) dos animais, sendo que destes, 58% (11/19) apresentavam-se co-infectados (Quadro 4). Os resultados apresentaram moderada correlação entre o ELISA e PCR ($kappa = 0.62$).

Quadro 1. Valores de densidade óptica dos níveis de ELISA (NE) para *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e percentual de animais (%) em cada intervalo

NE	A/P	<i>B. bovis</i>	A/P	<i>B. bigemina</i>
0	0 - 0.147	20%	0 - 0.129	25%
1	0.148 - 0.200	35%	0.130 - 0.175	21%
2	0.201 - 0.271	15%	0.176 - 0.238	23%
3	0.272 - 0.367	10%	0.239 - 0.323	13%
4	0.368 - 0.497	10%	0.324 - 0.437	9%
5	0.498 - 0.672	4%	0.438 - 0.591	3%
6	0.673 - 0.908	2%	0.592 - 0.799	1%
7	0.909 - 1.227	3%	0.800 - 1.080	2%
8	1.228 - 1.658	2%	1.081 - 1.459	3%
9	> 1.658	0%	> 1.459	0%

Quadro 2. Detecção sorológica e molecular de *Babesia* sp. em búfalos, Ilha do Marajó, Pará

<i>Babesia</i> sp.	PCR	
	Positivo	Negativo
ELISA		
Positivo	5	20
Negativo	10	65

Quadro 3. Prevalência de búfalos soropositivos para *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* por ensaio de imunoadsorção enzimático, Ilha do Marajó, Pará

ELISA	<i>Babesia bigemina</i>	
	Positivo	Negativo
<i>Babesia bovis</i>		
Positivo	150	49
Negativo	16	585

Quadro 4. Prevalência de búfalos positivos para *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* por reação em cadeia da polimerase, Ilha do Marajó, Pará

PCR	<i>Babesia bigemina</i>	
	Positivo	Negativo
<i>Babesia bovis</i>		
Positivo	11	7
Negativo	8	174

DISCUSSÃO

A prevalência sorológica e molecular de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* observadas neste estudo foi inferior aos resultados encontrados por Guedes et al. (2008) no Brasil e superiores aos encontrados por Terkawi et al. (2011) na Tailândia e por He et al. (2012) na China. A prevalência sorológica neste estudo foi 1.7 e 4.1 vezes maior do que Terkawi et al. (2011) observaram na Tailândia e 24 e 28 vezes maior do que He et al. (2012) observaram na China, para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. Neste estudo, o número de amostras co-infectadas (18.75%) foram superiores aos 3.9% observados por He et al. (2012).

A baixa frequência de búfalos soropositivos para *B. bovis* e *B. bigemina* sugere uma baixa taxa de transmissão desses organismos por carrapatos na região estudada. Esses resultados classificam a área como endemicamente instável para estes hemoprotozoários, segundo classificação de Mahoney & Ross (1972) e Terkawi et al. (2011). Assim, os búfalos podem atuar como reservatórios da babesiose bovina, representando um risco para rebanhos onde búfalos e bovinos são mantidos juntos.

Na avaliação molecular, os resultados deste estudo são 1.3 e 4.4 vezes superiores aos observados por Terkawi et al. (2011) para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente. No Brasil poucos estudos moleculares foram realizados para agentes da babesiose em búfalos. Corrêa (2011), embora tenha observado alta soroprevalência para *Babesia* sp., encontrou apenas um animal positivo na PCR para *B. bovis* e nenhum para *B. bigemina*.

Os resultados dos testes moleculares e serológicos não apresentaram alta concordância ($kappa = 0.62$). Estes resultados são similares aos observados por Corrêa (2011) e diferentes dos de Terkawi et al. (2011), que observaram alta concordância entre os testes. Porém, o número de animais positivos nestes dois estudos foi muito baixo, dificultando uma análise mais detalhada dos dados. Nossos resultados demonstram que a melhor alternativa em estudos sanitários e levantamentos epidemiológicos da babesiose bubalina seria a combinação entre as duas técnicas.

Na Argentina, Ferreri et al. (2008) observaram na província de Corrientes que, de 103 amostras de búfalos examinadas para *B. bovis*, apenas 35 (34%) tiveram reação positiva, enquanto um significativo número de amostras positivas na PCR foram detectadas em amostras da província de Lavalle 22/36 (61%). O hábito dos bubalinos manterem-se submersos na água pode é a explicação mais aceitável para a baixa prevalência de carrapatos e, consequentemente *Babesia* sp. em relação aos resultados observados para bovinos (Somparn et al. 2004, Terkawi et al. 2011).

Na Índia, os búfalos, em condições naturais, são raramente acometidos pela forma clínica da babesiose e acredita-se que sejam refratários a essa infecção devido à resistência imunológica natural (Roychoudhury & Gautam 1979). Porém, outros trabalhos relatam a babesiose como preocupante no rebanho bubalino da Índia. Muraleedharan et al. (1984) mencionaram que *B. bigemina* era comum tanto em búfalos quanto em bovinos.

Banerjee et al. (1988) observaram que os búfalos quando parasitados por *B. bigemina* não sofrem severamente, mas podem ser reservatórios em potencial para os bovinos, quando estes coabitam as mesmas pastagens. Assim, o elevado número de animais positivos na PCR e o baixo percentual de animais soropositivos no ELISA demonstram que estes animais podem ser vulneráveis e funcionar como um reservatório do agente no estado do Pará, o qual tem um dos maiores rebanhos bovinos do país e encontra-se em franca expansão.

CONCLUSÕES

Os resultados mostram uma baixa prevalência de anticorpos anti-*Babesia bovis* e anti-*Babesia bigemina* em búfalos da Ilha do Marajó.

Porém, observou-se que os agentes da babesiose bovina circulam em búfalos, podendo os mesmos atuar como reservatórios.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Pará (PROPEP/UFPA) e à Fundação de Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa (FADESP) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Araujo F.R., Madruga C.R., Leal C.R., Schenk M.A., Kessler R.H., Marques A.P. & Lemaire D.C. 1998. Comparison between enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody and rapid agglutination test in detecting antibodies against *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.* 74:101-108.
- Buling A., Criado-Fornelio A., Asenzo G., Benitez D., Barba-Carretero J.C. & Florin-Christensen M. 2007. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol.* 147:16-25.
- Corrêa F.N. 2011. Estudo epidemiológico de *Borrelia burgdorferi*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em búfalos (*Bubalus bubalis*) do Estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 99p.
- De la Fuente J., Naranjo V., Ruiz-Fons F., Höfle U., Mera I.G.F., Villanúa D., Almazán C., Torina A., Caracappa S., Kocan K.M. & Gortázar C. 2005. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in Central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5:390-401.
- Fahrimal Y., Goff W.L. & Jasmer D.P. 1992. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. *J. Clin. Microbiol.* 30:1374-1379.
- Ferreri L., Benitez D., Dominguez, M., Rodriguez A., Asenzo G., Mesplet M., Florin-Christensen M. & Schnittger L. 2008. Water buffalos as carriers of *Babesia bovis* in Argentina: animal biodiversity and emerging diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149:149-151.
- Figuerola J.V., Chieves L.P., Johnson G.S. & Buening G.M. 1993. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol.* 50:69-81.
- Goo Y.K., Jia H., Aboge G.O., Terkawi M.A., Kuriki K., Nakamura C., Kumagai A., Zhou J., Lee E.G., Nishikawa Y., Igarashi I., Fujisaki K. & Xuan X. 2008. *Babesia gibsoni*: serodiagnosis of infection in dogs by an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant BgTRAP. *Exp. Parasitol.* 118:555-560.
- Grisi L., Massard C.L., Borja G.E.M. & Pereira J.B. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Vet.* 21:8-10.
- Guedes-Junior D.S., Araújo F.R., Silva F.J.M., Rangel C.P., Barbosa-Neto J.D. & Fonseca A.H. 2008. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brazil. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 17:105-109.
- He L., Feng H.H., Zhang W.J., Zhang Q.L., Fang R., Wang L.X., Tu P., Zhou Y.Q., Zhao J.L. & Oosthuizen M.C. 2012. Occurrence of *Theileria* and *Babesia* species in water buffalo (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758) in the Hubei province, South China. *Vet. Parasitol.* 186:490-496.
- IBGE 2008. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <www.ibge.gov.br> Acesso em 5 jun. 2011.
- Kramer M.S. & Feinstein A.R. 1981. Clinical biostatistics. LIV. The biostatistics of concordance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 29:111-123.
- Machado R.Z., Montassier H.J., Pinto A.A., Lemos E.G., Machado M.R.F., Valadão I.F.F., Barci L.G. & Malheiros E.B. 1997. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection on antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Vet. Parasitol.* 71:17-26.
- Muraleedharan K., Syed Ziauddin K., Gopalaswamy K., Muraleedhar T. & Seshadri S.J. 1984. Some observations on clinical cases of *Babesia bovis* (Babes, 1888) Starcovici, 1893, in buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Indian Vet. J.* 61:76-79.
- Roychoudhury G.K. & Gautam O.P. 1979. Experimental studies on the pathogenicity of *Babesia bigemina* in buffalo calves. *Trop. Anim. Health Prod.* 11:91-93.
- Terkawi M.A., Huyen N.X., Shinuo C., Inpankaew T., Maklon K., Aboulaila M., Ueno A., Goo Y.K., Yokoyama N., Jittapalapong S., Xuan X. & Igarashi I. 2011. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. *Vet. Parasitol.* 178:201-207.
- Wilson R.A., Perrota Jr C., Frey B. & Eckroade R.J. 1984. An enzyme-linked immunosorbent assay that measures protective antibody levels to Newcastle disease virus in chickens. *Avian Dis.* 28:1079-1085.