

Níveis de IgG séricos em bezerros experimentalmente infectados pelo *Haemonchus placei*

Serum IgG level in calves experimentally infected with *Haemonchus placei*

Sandra Mayumi NISHI¹; Leonardo José RICHTZENHAIN¹; Solange Maria GENNARI¹

CORRESPONDÊNCIA PARA:
SOLANGE MARIA GENNARI
Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87 –
Cidade Universitária Armando Salles
Oliveira
05508-270 – São Paulo – SP
e-mail: sgennari@usp.br

¹ Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva e Saúde Animal da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da
USP, São Paulo - SP

RESUMO

Dois experimentos foram realizados para se conhecer a dinâmica dos anticorpos séricos (IgG) em bezerros após infecção com *Haemonchus placei*. No Experimento 1 estudou-se os níveis de IgG ao longo da primeira e segunda infecção. No Experimento 2 a influência de diferentes níveis protéicos da dieta e a resposta à infecção, medida através dos níveis de IgG séricos, foi observada em bezerros imunizados e não imunizados, através de infecções sucessivas e experimentalmente desafiados com L₃ de *H. placei*. Observou-se que os bezerros infectados desenvolveram resistência a reinfecções, com acentuado decréscimo nos valores de ovos por grama de fezes (OPG) na segunda infecção. Entretanto, nesse mesmo período, os níveis de IgG séricos mantiveram-se elevados, independentes do decréscimo do OPG. Observou-se também que bezerros submetidos a dieta protéica adequada apresentaram maior produção de IgG sérico, sugerindo uma melhor resposta às infecções quando comparados aos submetidos a dietas com níveis protéicos mais baixos.

PALAVRAS-CHAVE: *Haemonchus*. Bovinos. ELISA.

INTRODUÇÃO

Haemonchus placei é um nematódeo de elevada patogenicidade que acomete os bovinos. Juntamente com o gênero *Cooperia* spp. o *H. placei* é um dos parasitos de maior ocorrência no Brasil. Produz altas taxas de morbidade e conseqüentemente importantes perdas econômicas^{10, 11, 13}. É hematófago, produzindo lesões na mucosa do abomaso que podem causar perdas de sangue e plasma para a luz intestinal. Infecções maciças podem levar animais jovens a óbito por hipoproteïnemia e anemia aguda.

O parasitismo gastrointestinal em ruminantes está freqüentemente associado à alta densidade animal e a sistemas intensivos de manejo. Entretanto, nos ruminantes, o estado nutricional e particularmente a disponibilidade de proteínas e minerais é um fator importante na otimização da produtividade animal, interferindo na patogenia e nos mecanismos de resposta imune dos hospedeiros às infecções por nematódeos gastrointestinais^{1, 2, 8}.

O presente trabalho teve por objetivo conhecer a dinâmica dos anticorpos séricos (IgG) em bezerros na primeira infecção e em infecção sucessiva pelo *H. placei* e a influência do valor proteico da dieta sob os níveis de IgG, em bezerros infectados por esse nematódeo. Para tanto dois experimentos foram realizados:

Experimento 1 - Estudo dos níveis de IgG ao longo

da primeira e segunda infecção. **Experimento 2** - Influência de diferentes níveis protéicos da dieta e a resposta à infecção, medida pelos níveis de IgG séricos, em bezerros imunizados e não imunizados, através de infecções sucessivas, e experimentalmente desafiados com larvas infectantes (L3) de *H. placei*.

MATERIALE MÉTODO

Obtenção de larvas e adultos de *H. placei*

Bezerros criados livres de parasitos foram infectados com L3 oriundas de culturas puras de *H. placei* e utilizados como doadores de L₃ e vermes adultos. As larvas foram recuperadas a partir de culturas de fezes e utilizadas até 10 dias após a recuperação. Os adultos foram obtidos do abomaso dos doadores após a necrópsia, com a remoção do conteúdo e colheita manual, como descrito em Gennari et al.⁸.

Animais experimentais

Foram utilizados bezerros machos da raça Holandesa Preta e Branca, com idade aproximada de seis meses, criados desde o nascimento em baias coletivas, livres de parasitas e alimentados com ração comercial, feno de capim Coast Cross (*Cynodon dactylon*) e água ad libitum.

Delineamento experimental

Experimento I

Quinze animais foram divididos em dois grupos. No início do experimento (dia zero) dez bezerros receberam uma solução contendo 100.000 L₃ de *H. placei* por via oral e cinco foram mantidos como controles. Semanalmente foi realizada a contagem do número de ovos de nematódeos por grama de fezes (OPG) utilizando o método de McMaster modificado¹⁵. Quando 75% dos animais infectados atingiram valores de OPG inferiores a 100, os bezerros foram tratados com oxfendazole na dose de 2,5mg por kg de peso vivo (Systemex, Mallinckrodt Veterinária Ltda., Brasil) e quatro dias depois, novamente infectados com 100.000L₃ de *H. placei*. As contagens de OPG continuaram a ser realizadas semanalmente até o final do experimento (décima semana após a reinfecção).

Toda semana, amostras de sangue foram colhidas por meio de venopunção da veia jugular, utilizando tubos tipo Vacutainer de 5 ml. Os soros foram mantidos congelados a -20°C até a realização do ensaio imunoenzimático (ELISA).

Experimento II

Dezesseis bezerros foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de quatro animais cada. Dois grupos receberam dieta hipoproteica (BP), 213 g de proteína bruta (PB) por animal por dia, e dois grupos receberam dieta com níveis adequados de proteína (AP), com 469 g PB/animal/dia. Cinco semanas após o início das dietas, um dos grupos BP e um dos grupos AP foram oralmente infectados com 50.000 L₃ de *H. placei* (BP-I e AP-I). Os demais grupos foram mantidos como controles não infectados (BP-C e AP-C). No 25º dia pós-infecção (DPI), antes do início da patência, todos os animais infectados foram vermifugados com oxfendazole (2,5mg/kg de peso vivo - Systemex, Mallinckrodt Veterinária Ltda., Brasil). Quatro dias depois, os mesmos bezerros foram reinfecados com 50.000 L₃ e novamente vermifugados no 25º DPI. Após intervalo de quatro dias, todos os quatro grupos experimentais foram desafiados com 100.000 L₃ de *H. placei* e mantidos sob observação durante cinco semanas.

Amostras de fezes e de sangue dos animais foram colhidas durante todo o experimento, em intervalos semanais. Os soros foram mantidos a -20°C até a realização do ELISA e das fezes obteve-se os valores de OPG.

ELISA indireto

Como antígeno utilizou-se extrato antigênico bruto de adultos de *H. placei*, segundo Gennari e Tait⁹. A concentração protéica do extrato solúvel foi medida pelo método do ácido bicinonínico (BCA Protein Kit, Pierce). Microplacas de poliestireno (Nunc, Dinamarca) foram sensibilizadas com 10 mg/ml do antígeno solúvel de *H. placei* diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6 e incubadas em câmara úmida a 4°C durante uma noite. Utilizou-se soro equino a 4% e Tween 20 a 0,05% em salina tamponada (PBS 0,01M fosfato 0,15M NaCl pH 7,2) como

solução bloqueadora. As amostras de soro foram diluídas a 1:50 e incubadas durante 45 minutos a 37°C. A seguir, utilizou-se IgG de coelho anti-IgG bovino conjugado à peroxidase (Sigma, EUA) diluído a 1:1000 em PBS. Entre cada uma dessas etapas foram realizadas três lavagens das microplacas com PBS + Tween 20. Cinco minutos após a adição do substrato cromógeno (ortofenilenodiamina em tampão citrato-fostato pH 5,0 e H₂O₂) a reação enzimática foi interrompida com HCl 1N. A leitura da reação foi realizada por espectrofotometria com filtro 492 nm em leitor de microplacas (Multiskan-plus, Labsystems, Finlândia). Cada amostra de soro foi ensaiada em duplicata. Os valores médios das leituras em densidade óptica (D.O.) foram corrigidos em relação a uma amostra padrão positiva e negativa, com a obtenção do valor A/P (amostra/positivos), segundo a equação:

$$A/P = \frac{D.O. \text{ da amostra} - D.O. \text{ controle negativo}}{D.O. \text{ controle positivo} - D.O. \text{ controle negativo}}$$

onde,

D.O. da amostra = valor médio das densidades ópticas das duplicatas da amostra,

D.O. controle negativo = valor médio das densidades ópticas das duplicatas do soro controle negativo e

D.O. controle positivo = valor médio das densidades ópticas das duplicatas do soro controle positivo.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados através de Análise de Variância e as diferenças entre os grupos nas diferentes semanas experimentais foram medidas pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 1 ilustra os níveis de IgG séricos anti-*H. placei* detectados pelo ELISA e os valores de OPG em bezerros infectados pelo *H. placei* e controles, durante duas infecções consecutivas (Experimento 1). O período de patência iniciou-se na quarta semana pós-infecção com valores máximos de OPG observados na oitava semana e decaindo nas semanas seguintes. Dineen et al.⁷, em infecções por *Haemonchus contortus* em ovinos, também encontraram o pico de OPG entre a terceira e a quarta semana de patência.

Na reinfecção os bezerros também iniciaram a eliminação de ovos entre a quarta e quinta semana após a infecção (20ª semana experimental), mas com valores bastante reduzidos quando comparados aos valores de OPG da primeira infecção ($p < 0,05$), evidenciando o aparecimento da imunidade, resultados estes similares aos encontrados por Schallig et al.¹⁴, em ovinos.

Ao acompanhar a carga parasitária de ovinos observou-se que a fixação e o desenvolvimento de uma grande quantidade de vermes ocorre na primeira infecção por *H. contortus*. Nas infecções subsequentes, cada vez uma menor quantidade de larvas infectantes consegue se

estabelecer e chegar à fase adulta e, desses, as fêmeas apresentam-se menores e possuem menos ovos^{4,5}. Não há dados das variações de OPG em infecções subsequentes por *H. placei* em bovinos, mas parece haver semelhanças com as observações feitas na espécie ovina.

A produção de IgG foi detectada pelo ELISA entre a terceira e quarta semana após a primeira infecção. Os níveis de IgG inicialmente apresentaram-se baixos e foram se elevando até atingir um pico na sétima semana, se mantendo com pequenas oscilações até o final do experimento. Os níveis de IgG no grupo infectado foram superiores aos do grupo controle ($p < 0,05$) durante todo o experimento.

No Experimento II, tanto os bezerros imunizados (através de infecções truncadas pelo uso de anti-helmínticos) quanto os controles, apresentaram, durante o período de imunização, níveis semelhantes de IgG séricos ($p > 0,05$), independente do esquema nutricional (Fig. 2). Já após o desafio, os animais que receberam dieta com teores protéicos mais elevados (AP) apresentaram níveis de IgG mais altos independente de terem sido imunizados previamente ou não. Entre os animais infectados (Fig. 2-A) os bezerros do grupo AP apresentaram níveis mais altos de IgG nas semanas de 9 a 12 ($p < 0,05$) e nos controles (Fig. 2-B) a diferença entre os AP e BP foi observada da semana 10 à 13 ($p < 0,05$), também com os níveis de IgG maiores nos bezerros AP.

O valor médio mínimo e máximo de OPG na última semana experimental, foi de 750 e 450 OPG, respectivamente para os grupos BP-I e AP-I (imunizados) e de 875 e 500 OPG, respectivamente para os bezerros BP-C e AP-C (não imunizados). Apesar dos valores de OPG obtidos nos grupos com dieta hipoproteica terem sido superiores, esta diferença não foi significativa ($p > 0,05$). Adams (1983)³ observou o aparecimento de resistência em ovinos pós-infecção com *H. contortus*, com os valores de OPG bastante baixos e

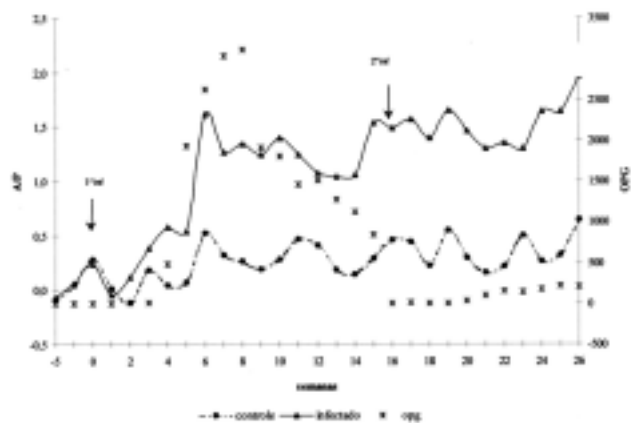


Figura 1

Níveis de IgG séricos anti-*H. placei* detectados pelo ELISA (A/P) e contagem de ovos por grama de fezes (OPG) em bezerros sob prima e segunda infecção e desafiados com 100.000 L₃ de *H. placei* e controles não infectados.

inferiores aos observados no presente trabalho com bovinos.

No entanto, independente dos valores de OPG, observou-se que os bezerros com uma dieta protéica a níveis adequados, conseguem superar melhor os efeitos do parasitismo, quando comparados a bezerros com dieta deficiente e submetidos ao mesmo desafio, resultados estes apresentados em Gennari et al.⁸. Observou-se que os valores de hematócrito, albumina, proteína sérica e sinais clínicos da hemonose apresentaram-se menos alterados nos animais com dietas protéicas adequadas. Observação semelhante pode ser constatada em relação à resposta humoral, com os valores de IgG superiores nos animais dos grupos AP ($p < 0,05$).

Devido ao pequeno tempo de observação dos animais após o início da patência, não foi possível analisar a possível correlação entre os valores de OPG e os níveis séricos de IgG, porém, sabe-se que a resposta humoral não é o único fator envolvido na resposta imune de ruminantes contra as infecções por helmintos, nos quais a resposta celular tem especial importância¹².

A presença de anticorpos tipo IgG em infecções por nematóides, não possui validade para diagnóstico, uma vez que é comum reação cruzada entre os tricostrongilídeos⁶, mas permite a obtenção de informações sobre a dinâmica da resposta imune em condições experimentais.

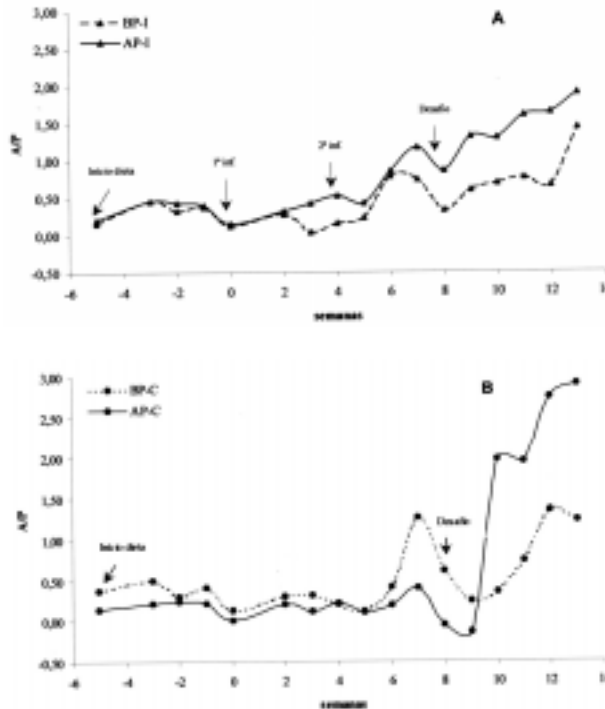


Figura 2

Níveis de IgG séricos anti-*H. placei* detectados pelo ELISA (A/P) em bezerros submetidos a dieta hipoproteica (BP) e com teores adequados de proteína (AP). A – imunizados (I) com duas doses de 50.000 L₃ e desafiados com 100.000 L₃ de *H. placei*. B – somente desafiados sem imunização (C).

CONCLUSÕES

Os bezerros infectados com *H. placei* desenvolvem um bom grau de resistência a reinfecções, uma vez que a contagem de ovos nas fezes é acentuadamente maior na primeira infecção.

O contato prévio com o *H. placei* não refletiu nos níveis de IgG sérico após o desafio.

Bezerros submetidos a dieta protéica adequada apresentam maior produção de IgG sérico que os submetidos a dietas com níveis protéicos mais baixos.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo financiamento do projeto e ao CNPq pela bolsa de aperfeiçoamento a S.M. Nishi.

SUMMARY

Two experiments were conducted to determine the serum antibody (IgG) dynamic in calves infected with *Haemonchus placei*. At Experiment 1, the IgG level during the first and second experimental infection were measured and at Experiment 2, the influence of dietary protein and immunization on IgG levels. The calves were immunized using successive *H. placei* infection truncated by the use of anthelmintic and challenged with 100,000 L₃. The infected calves developed a high level of protection, with a significant reduction on fecal egg counts (EPG) at the second infection. However, at the same period, the IgG values continue to presented high levels, independent of the EPG decrease. It was also observed that calves submitted to an adequate protein diet presented a higher IgG level, suggesting an influence on immune response to the infection when compared to the low protein diet calves.

KEY-WORDS: *Haemonchus*. Bovine. ELISA.

REFERÊNCIAS

- 1.ABBOTT, E. M.; PARKINS, J. J.; HOLMES, P. H. Influence of dietary protein on parasite establishment and pathogenesis in Finn Dorset and Scottish Blackface lambs given a single moderate infection of *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v. 38, n. 1, p. 6-13, 1985.
- 2..ABBOTT, E. M.; PARKINS, J. J.; HOLMES, P. H. Influence of dietary protein on the pathophysiology of haemonchosis in lambs given continuous infections. **Research in Veterinary Science**, v. 45, n. 1, p. 41-49, 1988.
- 3.ADAMS, D. B. Observation on the self-cure reaction and other forms of immunological responsiveness against *Haemonchus contortus* in sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 13, p. 571-578, 1983.
- 4.BARGER, I. A.; JAMBRE, L. F.; GEORGI, J. R.; DAVIES, H. I. Regulation of *Haemonchus contortus* populations in sheep exposed to continuous infection. **International Journal for Parasitology**, v. 15, n. 5, p. 529-533, 1985.
- 5.CHRISTIE, M. G.; HART, R.; ANGUS, K. W.; DEVOY, J.; PATTERSON, J. E. Resistance to *Haemonchus contortus* in sheep given repeated daily doses of 10 000 infective larvae. **Journal of Comparative Pathology**, v. 88, n. 2, p. 157-165, 1978.
- 6.CUQUERELLA, M.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; CARRERA, L.; DE LA FUENTE, C.; ALUNDA, J. M. Cross antigenicity among ovine trichostrongyloidea. Preliminary report. **Veterinary Parasitology**, v. 53, n. 3-4, p. 243-251, 1994.
- 7.DINEEN, J. K.; DONALD, A. D.; WAGLAND, B. M.; OFFNER, J. The dynamics of the host parasite relationship – The response of sheep to primary infection with *Haemonchus contortus*. **Parasitology**, v. 55, n. 1, p. 515-525, 1965.
- 8.GENNARI, S.M.; ABDALLA, A. L.; VITTI, D.M.S.S.; MEIRELLES, C.F.; LOPES, R.S.; VIEIRA BRESSAN, M.C.R. *Haemonchus placei* in calves: effects of dietary protein and multiple experimental infection on worm establishment and pathogenesis. **Veterinary Parasitology**, v. 59, n.2, p. 119-126, 1995.
- 9.GENNARI, S. M.; TAIT, A. Na attempt to vaccinate sheep with whole homogenate of third-stage and adult *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 2, p. 131-135, 1992.
- 10.GUIMARÃES, M. P.; RIBEIRO, M. F. B.; FACURI-FILHO, E. J.; LIMA, W. S. Strategic control of gastrointestinal nematodes in dairy calves in Florestal, Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 24, n. 1, p. 31-38, 2000.
- 11.HONER, M. H.; VIEIRA BRESSAN, M. C. R. Nematódeos no Brasil. O estado da pesquisa – 1991. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 67-79, 1992.
- 12.KEUS, A; KLOOSTERMAN, A; VAN DEN BRINK, R. Detection of antibodies to *Cooperia* spp. in calves with the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Veterinary Parasitology**, v. 8, n. 3, p. 229-236, 1981.
- 13.LIMA, W. S. Seasonal infection pattern of gastrointestinal nematodes of beef cattle in Minas Gerais State – Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 2-4, p. 203-214, 1998.
- 14.SCHALLIG, H. D. F. H.; VAN LEEUWEN, M. A. W.; BERNADINA, W. E.; HENDRIKX, W. M. L. Serum antibody responses of Texel sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v. 57, n. 1, p. 63-68, 1994.
- 15.WHITLOCK, H. V. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 21, p. 177-180, 1948.

Recebido para publicação: 19/09/2001
Aprovado para publicação: 27/02/2002