

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA**

**LUIZ FELIPE DA SILVA GEMELLI**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR  
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Área de concentração: Sanidade Animal**

**Uruguaiana  
2019**

**LUIZ FELIPE DA SILVA GEMELLI**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR  
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular  
Supervisionado em Medicina Veterinária  
da Universidade Federal do Pampa,  
apresentado como requisito parcial para  
obtenção do Título de Bacharel em  
Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Gallina

**Uruguaiiana  
2019**

**LUIZ FELIPE DA SILVA GEMELLI**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR  
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular  
Supervisionado em Medicina Veterinária  
da Universidade Federal do Pampa,  
apresentado como requisito parcial para  
obtenção do Título de Bacharel em  
Medicina Veterinária.

Relatório defendido e aprovado em: 07, de junho de 2019.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Tiago Gallina  
Orientador  
UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Mário Celso Sperotto Brum  
Unipampa

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. Carolina Kist Traesel  
Unipampa

Dedico esta conquista a meus pais, Antonio (*in memoriam*) e Gilsa, sem seus ensinamentos não teria vencido esta etapa, aos meus avós que junto a meu pai tenho certeza que me acompanharam ao meu lado por toda esta caminhada.

## AGRADECIMENTO

Chega o final de mais uma etapa. A vida é formada por várias, desde muito pequeno viemos batalhando e vencendo cada uma delas! Algumas se demonstram longas e difíceis, outras nem tanto, mas sempre seguimos em busca de conhecimento e novas fases para que possamos crescer cada vez mais.

Agradeço os meus pais Antonio (*in memoriam*) e Gilsa, que me ensinaram costumes e valores, construíram em mim uma base a qual levarei comigo por toda a vida. A minha irmã Madalena, que sempre me mostrou o caminho do que é certo, me ouviu e aconselhou. Ao meu cunhado Gerson, o qual somos verdadeiros irmãos. A alegria e descontração dos pequenos Mateus e Gabriela, sobrinhos estes que exaltam felicidade em nossa família. Aos familiares que mesmo estando separados por uma longa distância, nunca deixaram de se fazer presentes. Aos meus padrinhos Alcindo e Beatriz, estes que sempre estiveram ao meu lado, me ajudando e aconselhando.

Foram anos longe de casa, no início praticamente perdido por não conhecer ninguém, mas aos poucos tudo foi mudando e amigos sendo conquistados pelo caminho. A todos estes o agradecimento vem pelos momentos de descontração e festa, mas também pelos de seriedade e estudo.

Durante toda a graduação fiz parte de uma equipe a qual me falta palavras para agradecer, o laboratório de Parasitologia, que foi como uma segunda casa em Uruguiana, estendendo a toda equipe a qual formamos uma verdadeira família, agradeço ao professor, amigo e nosso pai Tiago Gallina, vulgo Tato, que compartilhou conosco todas suas experiências e ensinamentos, não só sobre a medicina veterinária, mas também da vida.

A toda equipe de sanidade animal do INTA Mercedes, onde me acolheram em seu ambiente de trabalho e me transmitiram ensinamentos sem medir esforços. Além destes, me possibilitaram vivenciar uma cultura diferente conhecer lugares e fazer amigos, experiências as quais andam junto na bagagem com o conhecimento adquirido.

“Ideais são como estrelas; você não conseguirá tocá-las. Mas, como o marinheiro no deserto das águas, você as escolhe como guias e, ao segui-las, alcançará seu destino.”

Carl Schurz

## RESUMO

O presente relatório tem como objetivo descrever as atividades realizadas e/ou acompanhadas durante o período de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) e discutir o tema Tristeza Parasitária Bovina (TPB), atividade de maior abordagem durante o estágio. Este que foi realizado no período de 25 de fevereiro a 19 de maio de 2019, totalizando a carga horária de 480h, sob orientação do Prof. Dr. Tiago Gallina e supervisão do Médico Veterinário Nestor Fabian Sarmiento, sendo o mesmo realizado no *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria* (INTA), na *Estación Experimental Agropecuaria Mercedes* (EEA Mercedes - AR), localizado na cidade de Mercedes, província de Corrientes, Argentina, na área de sanidade animal. As atividades mais frequentes envolveram projetos de pesquisa relacionados à TPB e produção dos imunógenos utilizados para a prevenção desta enfermidade.

**Palavras-Chave:** *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, Tristeza Parasitaria Bovina

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Mapa da província de Corrientes com representação do centro regional do INTA Corrientes, EEA Mercedes e demais estações dentro da Província.....	13
Figura 2-	Coleta de sangue pela veia jugular.....	17
Figura 3-	Realização de hematócrito. Figura A- Leitura do microcapilar. Figura B- Microcentrífuga digital.....	18
Figura 4-	Realização da tricotomia em ponta de cauda para obtenção de sangue periférico (A). Passos para realização do esfregaço sanguíneo (B). Visualização em microscópio ótico, presença de estruturas compatíveis com <i>Babesia bigemina</i> (C).....	19
Figura 5-	Coleta de sangue em bolsa de transfusão.....	20
Figura 6-	Preparo do imunógeno em capela de fluxo.....	21
Figura 7-	Coleta de sangue ovino (A) e aplicação da técnica FAMACHA (B)..	23
Figura 8-	Visualização por microscopia óptica de esfregaço sanguíneo, células parasitadas com: <i>A. centrale</i> (A), <i>A. marginale</i> (B), <i>B. bovis</i> (C) e <i>B. bigemina</i> (D).....	30



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades desenvolvidas durante o ECSMV .....	14
---	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....</b>	<b>13</b>
2.1 Descrições das atividades.....	14
2.1.1 Procedimentos anteriores a produção de imunógeno para TPB.....	15
2.1.1.1 Esplenectomia.....	15
2.1.1.2 Inoculação dos agentes da TPB.....	15
2.1.1.3 Acompanhamento de bovinos inoculados.....	16
2.1.1.4 Obtenção das cepas para produção do imunógeno.....	19
2.1.2 Produção do Imunógeno contra TPB.....	20
2.1.3 Coleta de materiais para diagnóstico em ovinos.....	21
<b>3 DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
3.1 Tristeza parasitária bovina.....	24
3.1.1 Babesiose bovina .....	26
3.1.2 Anaplasmosose bovina.....	27
3.1.3 Diagnóstico.....	29
3.1.4 Controle e prevenção.....	31
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A população humana mundial vem sofrendo um constante crescimento, onde apresenta uma maior porcentagem de indivíduos vivendo em áreas urbanas. Estimativas mostram que entre os anos de 2017 a 2050, a população mundial crescerá em 29%, sendo que dentre o total 70% estará em zonas urbanas. Sendo assim a produção de alimentos para suprir a demanda da população deve ter um aumento semelhante quando comparado à produção total de 2017. Mais especificamente, a produção de carne deve ter um aumento de 200 milhões de toneladas até o estimado período (FAO, 2017).

Em 2018 o rebanho mundial de bovinos teve um volume contabilizado em mais de um bilhão de animais, onde o Brasil possui 23,2% deste total, ocupando o segundo lugar, com maior população de animais no Centro-oeste do país e alta expressividade da raça zebuína, sendo a base do rebanho nacional, ficando somente atrás da Índia com 305 milhões de animais. Porém em rebanho comercial ocupamos o primeiro lugar (IBGE, 2017). A estimativa é de que no ano de 2019 o Brasil passe a produzir 10,2 milhões de toneladas de carne, 3% a mais do que no ano anterior. Estes números de produção levam o país ao topo da lista de exportadores de carne bovina, com um volume de exportação de 2,02 milhões de toneladas de carne (IBGE, 2018).

Da mesma forma como ocorre no Brasil à pecuária de corte é fundamental na economia da Argentina, no entanto em menores números, o país conta com 53,76 milhões cabeças e corresponde a 5,4% do total mundial. Após a crise financeira e política que afetou seu setor primário, a Argentina vinha se recuperando, e obteve um aumento de 0,47% no seu rebanho (FORMIGONI, 2018). Segundo Formigoni (2017), esse acréscimo no saldo dos rebanhos ocorre devido ao clima favorável durante a estação reprodutiva e considerável aumento na produção de bezerros, além da queda no abate de fêmeas, o que justifica a melhoria na rentabilidade da atividade. Conhecida pela sua carne de qualidade com base racial europeia, o país em 2005 chegou ao terceiro lugar na exportação mundial, anos mais tarde caiu para o décimo primeiro lugar, e em 2018 a “*Cámara de la Industria y Comercio de Argentina*” (CICCRA) indicou uma produção de 3 milhões de toneladas. Porém se exportaram 328.327 toneladas, 72,1% a mais quando comparado no ano anterior, ocupando o sexto exportador mundial de carne bovina, com sistemas de

confinamento como inovação tecnológica das últimas décadas (FARBER, 2019). A partir desses dados é possível avaliar que a pecuária de corte está em constante crescimento e necessita sobretudo garantir a produtividade e qualidade para suprir o mercado tanto no Brasil como na Argentina. Contudo há limitações dentro do ciclo pecuário que poderiam ser solucionadas, aumentando os números e consequentemente a eficiência dos sistemas de produção.

O desequilíbrio em bases como reprodução, nutrição, genética e sanidade, reflete um desbalanço em outras áreas fundamentais para o desenvolvimento da produção pecuária, trazendo altos prejuízos. No que tange a sanidade animal, as doenças parasitárias são as que apresentam maior relevância nas perdas econômicas observadas nos diferentes sistemas de criação bovina do Brasil. Dados observados por Lucena et al. (2010), no sul do Brasil mostram que a doença que lidera o número de casos de enfermidades parasitárias e que causa maiores perdas produtivas e econômicas em bovinos é a TPB, segundo dados de necropsias do autor. Na vizinha Argentina a parasitose também apresenta importantes prejuízos na cadeia bovina na região norte, uma vez que está situada em uma região de clima tropical e subtropical corresponde entre os paralelos 32°N e 32°S onde os carrapatos, vetores desta enfermidade estão presentes em alta frequência (SACCO, 2002).

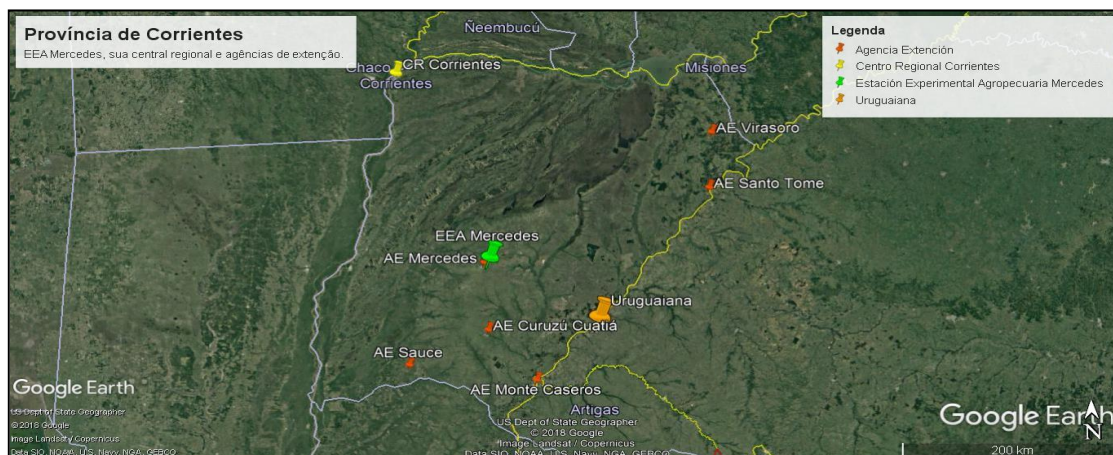
Portanto com o objetivo de ampliar os conhecimentos na área de sanidade animal e no setor de parasitologia, o local escolhido para a execução do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) foi o *Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria* (INTA) junto a *Estación Experimental Agropecuaria* (EEA) Mercedes, na Argentina, sob a supervisão do Médico Veterinário Nestor Fabian Sarmiento. As principais atividades acompanhadas e/ou desenvolvidas envolveram experimentos relacionados aos agentes da TPB, como: avaliação de cepa atenuada de agentes da doença, produção do imunógeno para prevenção e acompanhamento pós-aplicação do mesmo imunógeno em propriedades rurais.

## 2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O local de estágio foi em uma das unidades do INTA, este instituto de pesquisas que abrange todo o território nacional Argentino, tendo como atividades a pesquisa e extensão, de uma forma geral para o setor agropecuário. Suas divisões consistem de uma sede nacional, localizado em Buenos Aires e divisões regionais, onde cada província possui um centro regional subdividido. A EEA Mercedes foi o local escolhido e está localizada na Rua Juan Pujolal Estes s/n, na cidade de Mercedes, Corrientes (Figura 1). Além da EAA Mercedes, o *Centro Regional Corrientes* (CR Corrientes) conta com mais duas estações experimentais, a Corrientes Sombrerito, na cidade de Corrientes e a Bella Vista na cidade de Bella Vista. A EEA Mercedes divide-se em departamentos de reprodução animal, produção animal, produção vegetal e sanidade animal. Possui uma área de 1.989 hectares para produção e pesquisa, e todo seu desenvolvimento em pesquisas gira em torno da bovinocultura de corte, ovinocultura corte e lã além de produção em pastagens cultivadas e naturais. Conta com seis agências de extensão distribuídas nas cidades de Curuzú Cuatiá, Monte Caseros, Sauce, Mercedes, Santo Tomé e Virasoro.

O ECSMV foi realizado no departamento de sanidade animal, tendo como principais objetivos de acompanhamento de diagnóstico, controle e prevenção do complexo TPB.

FIGURA 1- Imagem de satélite da província de Corrientes com representação do centro regional do INTA Corrientes (ponto em amarelo), EEA Mercedes (ponto verde) e demais estações dentro da província (pontos vermelhos).



Fonte: Adaptado Google Earth.

## 2.1 Descrições das atividades

Durante o ECSMV foram acompanhadas atividades relacionadas a projetos de pesquisa em sanidade animal, voltados à área de parasitologia do INTA Mercedes. O projeto em andamento era intitulado *“Evaluación comportamiento clínico de la cepa ‘Bbi M2P (Babesia bigemina patógeno Chavarria)’ en 10 vaquillas de 2 años de edad”*. Além desta, foram acompanhadas atividades sobre o diagnóstico, controle e prevenção da TPB também junto da produção do imunógeno contra a doença.

A mais da área de hematozoários, também foi possível acompanhar a Médica Veterinária Dra. Bibiana Cetra, responsável pelo setor de helmintologia da EEA Mercedes. Com ela foram realizadas coletas de fezes em ovinos para diagnóstico helmintológico, coleta de amostras de sangue e realização da técnica FAMACHA, onde os dados obtidos faziam parte de um projeto em andamento denominado *“Identificación de ovinos resistentes a parásitos gastrointestinales”*.

Durante o período também foram acompanhados eventos relacionados a TPB e controle de carrapatos, onde denominavam-se *“Jornadas de bioensayos de garrapaticidas”* e palestras ministradas pelo Médico Veterinário Nestor Sarmiento intituladas *“Control y prevención de la tristeza bovina”*.

Tabela 1 – Atividades desenvolvidas durante o ECSMV ligadas a Tristeza Parasitária Bovina segundo a cronologia para produção de imunógenos.

<b>Atividades</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Esplenectomia	8	0,7
Inoculação de agentes atenuados	18	1,6
Coleta de amostra sanguínea	200	18,2
Verificação de volume globular	200	18,2
Aferição de Temperatura corporal	200	18,2
Esfregaço sanguíneo	400	36,4
Obtenção de cepas	36	3,2
Produção de imunógeno*	30	2,7
Participação em eventos	4	0,3
<b>Total</b>	<b>1096</b>	<b>(100%)</b>

As atividades expostas no “n” equivalem o número de vezes de contato com a técnica executada. \* 30 atividades que corresponderam a produção de 44000 doses  
Fonte: o autor.

Outras atividades que corresponderam a setores ligados a sanidade, como as de interesse em ovinocultura foram 138 coletas e processamento de sangue para verificação de volume globular (VG) pela técnica de micro hematócrito e verificação subjetiva de grau de anemia pelo método FAMACHA dos mesmos animais. Também foram acompanhadas quatro atividades de extensão sobre o tema TPB em diferentes localidades e províncias (Córdoba e Corrientes).

### **2.1.1 Procedimentos Anteriores a produção do imunógeno para TPB**

No EEA Mercedes os bovinos selecionados para produção de imunógenos possuíam entre três e 12 meses de idade, e eram testados para doenças como língua azul, IBR, BVD, brucelose, leucose, febre aftosa, bem como eram livres de agentes da TPB. Os testes imunológicos eram realizados no INTA Castelar e Rafaela.

Os animais selecionados eram deslocados para áreas isoladas de outros bovinos e conforme a necessidade de produção eram submetidos aos próximos passos para a produção do imunógeno.

#### **2.1.1.1 Esplenectomia**

Esta técnica corresponde a retirada total do baço, órgão que tem importante ação na produção de fatores de imunidade inata do indivíduo aos parasitos intracelulares, além de ser responsável pela degradação de células parasitadas do sangue (TIZARD, 2009).

No INTA Mercedes esta técnica era utilizada em bovinos entre três e 12 meses de idade, para multiplicação dos agentes atenuados da TPB e posterior produção do imunógeno contra a doença, sua função é para que os animais diminuam sua capacidade de resposta imunológica contra os agentes atenuados, possibilitando a multiplicação para a obtenção de maior quantidade dos mesmos.

#### **2.1.1.2 Inoculação dos agentes da TPB**

Para a inoculação nos bezerros eram utilizados 5 ml de sangue contendo a cepa atenuada de *B. bovis* ou *B. bigemina*. Para produção do imunógeno contra o *A. marginale*, era utilizada cepa de *A. centrale* a qual não é patogênica e garante uma



resposta imune cruzada. Em cada bezerro era inoculado um agente, ou seja, são utilizados três animais por produção. A inoculação era realizada via intravenosa na veia jugular.

Esse sangue podia ter duas origens, sendo uma a partir da atenuação e armazenamento das cepas em pequenos frascos, os quais eram mantidos em botijões com nitrogênio líquido, esse material congelado era crioprotegido por uma solução diluidora de dimetilsulfóxido (DMSO) a 15%, a fim de diminuir os efeitos que podem trazer danos às células e conseqüente morte dos agentes. Outra forma é utilizar uma quantidade da mesma amostra a qual foi realizada a produção anterior, ou seja oriundo dos animais doadores, desde que o mesmo tenha uma porcentagem de parasitismo acima de 2% (quanto maior esta porcentagem melhor) de hemácias parasitadas e não ultrapasse os 15 dias de armazenamento refrigerado entre 2 e 8°C.

No momento da inoculação do agente nos animais é realizada a aplicação de dexametasona, com intuito de causar uma imunossupressão e reduzir a resposta imune, assim possibilitando a multiplicação do agente.

### **2.1.1.3 Acompanhamento de bovinos inoculados**

Cerca de quatro dias após a inoculação se dá início o processo de acompanhamento nos animais, e estes continuavam sendo realizados até o dia da coleta para a produção do imunógeno. Consistia nos mesmos procedimentos base da realização do diagnóstico da TPB, que são observação do comportamento do animal, coleta de sangue total para aferir o nível de VG, aferição de temperatura via retal e realização de esfregaço sanguíneo para a visualização, identificação e quantificação do agente.

A TPB tem como uma de suas principais conseqüências a anemia, sendo que o conhecimento da porcentagem do VG do animal é possível identificar se há ou não alterações (KESSLER; SCHENK, 1998). Nos projetos de pesquisa acompanhados foram realizadas coletas para o monitoramento dos terneiros utilizados na produção do imunógeno, e o sangue era coletado da veia coccígea ou jugular de cada animal, com seringas de 5 ml e agulhas 40x12 individuais, armazenado em tubos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Figura 2). Da mesma forma eram avaliados a campo animais pós-aplicação do imunógeno que



compreendiam grupos de novilhas, vacas e touros ou animais de propriedades com suspeita da doença.

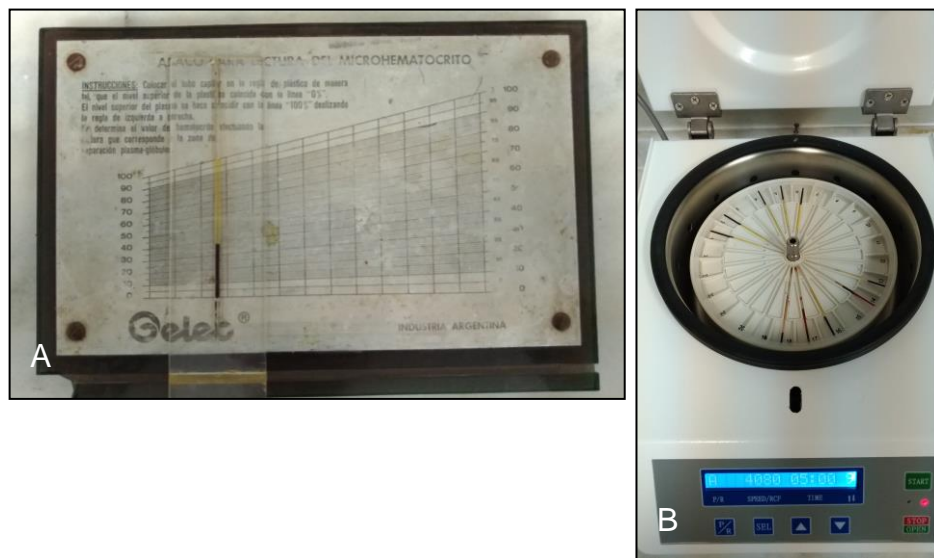
O nível de VG obtido pela amostra de sangue total corresponde à percentagem de hemácias presentes no sangue. Quando há presença dos agentes da TPB ocorre uma queda neste indicador se comparado ao fisiológico, isso se deve principalmente a hemólise ou sequestro da célula parasitada. A amostra a ser testada era colocada em tubos de micro capilar, e uma de suas extremidades era fechada para centrifugação, para a leitura se utilizava um leitor de micro hematócrito que possibilitava que o nível em porcentagem fosse quantificado. Inicialmente era usado o padrão de ficha de leitura (Figura 3A), posteriormente o INTA Mercedes adquiriu uma centrífuga mais sofisticada que facilita a leitura do VG, pois além de ser eletrônica digital para tempo e rotação, há um dispositivo que substituía o cartão de papel para leitura (Figura 3B).

Figura 2- Coleta de sangue pela veia jugular.



Fonte: o autor

Figura 3- Realização de hematócrito. Leitura do microcapilar (A). Microcentrífuga digital (B).



Fonte: o autor.

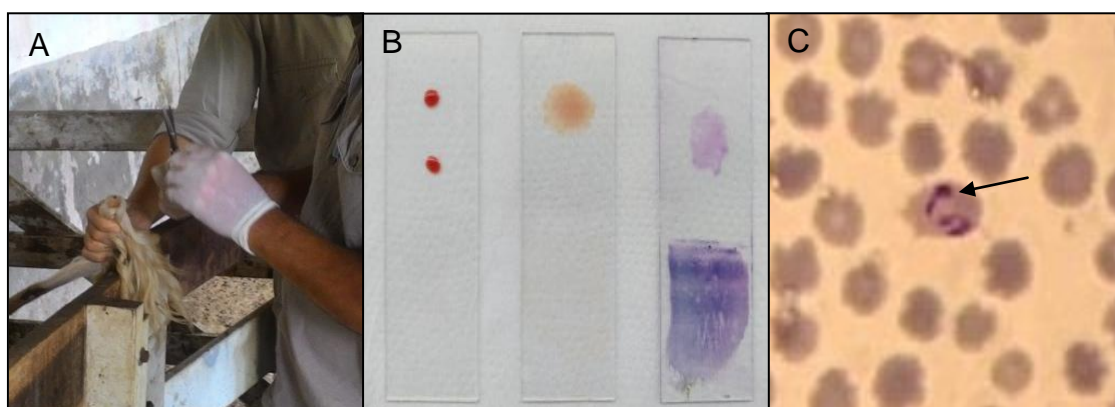
A informação obtida pelo ato de aferir a temperatura média corporal do animal faz parte do conjunto de parâmetros para o diagnóstico da TPB, uma vez que a hipertermia é um dos sinais demonstrados por ambos os agentes da doença (FARIAS, 1995). Durante o ECSMV os mesmos animais que eram realizados as coletas de sangue passavam pelo procedimento. O padrão de unidade utilizado para análise era em graus Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ), o qual era aferido com a utilização de termômetro digital que era introduzido por via retal nos bovinos levando um tempo médio de três minutos para obter o resultado.

Uma técnica de suma importância no diagnóstico direto de hemoparasitoses é o esfregaço sanguíneo, pois a partir dele era possível a visualização, identificação e quantificação de agentes da TPB. Este deve ser realizado com sangue periférico do animal, pelo fato de um dos agentes da doença (*B. bovis*) apresentar um tropismo por pequenos capilares, sendo realizado da extremidade de cauda ou extremidade de orelha dos bovinos (VANZINI; RAMIREZ, 1994), porém há relatos de que a explicação seja pela interferência na capacidade da hemácia de deslocar pelo microcapilares por falta de flexibilidade de sua superfície (FARIAS, 1995).

O esfregaço sanguíneo era realizado em propriedades com a suspeita da doença, e no INTA Mercedes em terneiros utilizados para a produção do imunógeno, principalmente para quantificar a parasitemia. Para a obtenção das amostras era

realizada tricotomia da extremidade da cauda com tesoura e com uma agulha hipodérmica era efetuada uma pequena punção na pele (Figura 4A), a qual possibilitava o surgimento de gotículas de sangue proveniente de capilares periféricos. Em uma lâmina de vidro lisa eram colocadas duas gotículas, sendo uma para a confecção de um esfregaço fino e outra de uma gota espessa, após era realizada uma fixação em metanol PA e corada por técnica de coloração em Giemsa (Figura 4B). A visualização era realizada em microscopia óptica em aumento de 1000x em imersão (Figura 4C).

Figura 4- Realização da tricotomia em ponta de cauda para obtenção de sangue periférico (A). Passos para realização do esfregaço sanguíneo (B- da esquerda para direita, deposição da gotícula, esfregaço espesso e delgado antes e após coloração) visualização em microscópio ótico, presença de estruturas compatíveis com *Babesia bigemina* (C- seta).



Fonte: o autor

#### 2.1.1.4 Obtenção das cepas para produção do imunógeno

Através do acompanhamento clínico e hematológico após inoculação dos agentes atenuados (babesias) e da cepa de *A. centrale*, obtinham-se resultados que determinavam a tomada de decisão do momento em que se deveria efetuar a coleta das amostras para a produção do imunógeno e/ou tratamento dos animais para evitar que a doença provoca-se o óbito nos mesmos.

Os parâmetros determinantes eram atingir porcentagem próxima ou igual a de 20% para VG e de 2% para parasitemia, sendo que após a coleta era realizado o tratamento, reduzindo o risco da perda do animal, bem como possibilitando do mesmo voltar a ser reutilizado na produção de outro imunógeno ou terminação.

Na coleta eram utilizadas bolsas de coleta de sangue com EDTA, sendo que era coletado de cada doador aproximadamente um litro de sangue (Figura 5). Após a coleta o material era acondicionado sob refrigeração no laboratório (4 a 8°C). Uma vez resfriado já se realiza a produção do imunógeno.

Figura 5- Coleta de sangue em bolsa de transfusão.



Fonte: O autor

### 2.1.2 Produção do imunógeno contra TPB

O imunógeno contra a TPB é produzido com base em duas formulações, uma com o objetivo de proteger os animais contra Anaplasmosse (ANACENT) e outra, uma tríplice, contra Anaplasmosse e Babesiose (BABESAN). As formas de produção, quando comparadas são parecidas, sendo que na ANACENT, somente irá estar presente cepa contendo *A. centrale* e na BABESAN apresenta cepa de *A. centrale* e cepas atenuadas de *B. bovis* e *B. bigemina*.

Com as cepas dos três agentes já resfriadas em laboratório e seus valores de VG e parasitemia conhecidos, era definida através de uma tabela a quantidade de doses do imunógeno que seria possível produzir a partir de 1 ml de sangue. Tendo esta informação para cada amostra, realizava-se o cálculo de proporção de sangue, solução tampão (Buffer) e de antibiótico para que cada dose contivesse  $1 \times 10^7$

células parasitadas por dose de 3ml de vacina. O antibiótico utilizado era uma associação comercial de penicilina + estreptomicina, utilizada no volume de 2ml para cada litro de imunógeno, que garantia uma inibição do crescimento de possíveis agentes contaminantes no produto gerado. O Buffer tinha como função a estabilidade do pH na composição e um equilíbrio osmótico no meio gerado, garantindo integridade celular tendo menores perdas dos antígenos.

O imunógeno era preparado em capela de fluxo e o material utilizado em contato direto ao produto era previamente esterilizado em autoclave a fim de evitar qualquer tipo de contaminação. Em um frasco de Mariotte era colocado a quantidade de Buffer e com auxílio de um agitador era realizada a homogeneização. Utilizando proveta graduada o sangue contendo a cepa era quantificado e acrescentado ao frasco, seguindo o volume de antibiótico correspondente (Figura 6).

Ainda em capela de fluxo, o produto era envasado em frascos plásticos conforme a demanda recebida. Os mesmos eram fechados com tampões de borracha e o processo de vedação e identificação dos frascos ocorria em outro ambiente, onde a vedação era em outra capela de fluxo.

Após prontas eram mantidas refrigeradas, sendo enviadas aos produtores em caixas com isolamento térmico ou retiradas no próprio laboratório pelos mesmos.

Figura 6- Preparo do imunógeno em capela de fluxo.



Fonte: O autor



### 2.1.3 Coletas de materiais para diagnósticos em ovinos

As verminoses gastrointestinais em ovinos trazem significativas perdas a produção e economia das propriedades, principalmente se tratando do nematódeo *Haemonchus contortus*. Com o intuito de reduzir o processo de seleção de parasitos resistentes a princípios ativos, um método o qual era realizada a visualização da conjuntiva ocular, e através da coloração era determinada o grau de anemia relacionando o mesmo com a presença do parasito, assim podendo ser tomada a decisão de se o animal receberia ou não o anti-helmíntico, método este denominado FAMACHA (MOLENTO et al., 2004). Diferente do que é abordado nos cursos no Brasil, na EEA Mercedes era utilizado um painel de fundo branco para facilitar o contraste da cartela padrão e a conjuntiva.

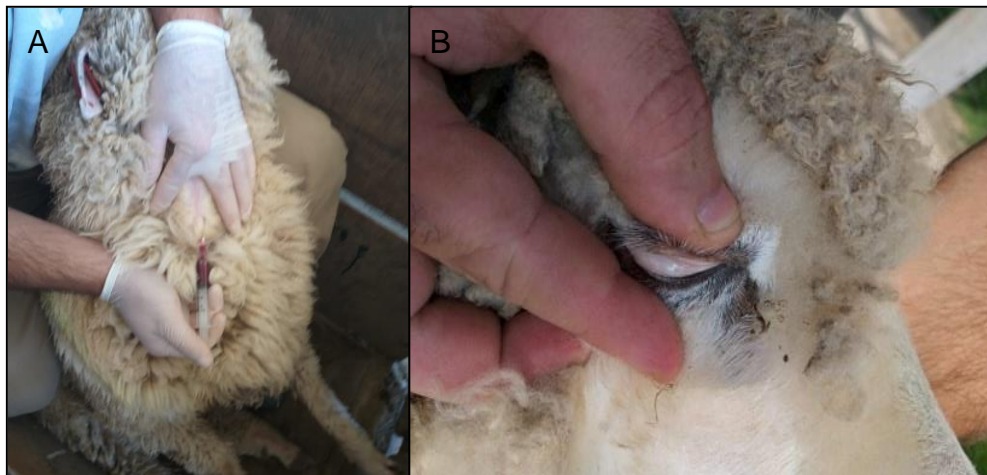
As coletas de amostras de sangue e fezes de ovinos eram realizadas em cordeiros machos e fêmeas no próprio campo de produção do EEA Mercedes. Sua finalidade era a análise de dados para a seleção de animais resistentes a parasitose, principalmente *H. contortus*, parasito hematófago que tem como órgão de eleição o abomaso destes animais e é o principal nematódeo de pequenos ruminantes (AMARANTE, 2011).

A coleta de fezes em ovinos é utilizada no diagnóstico parasitológico de nematódeos gastrintestinais a partir da técnica de Gordon e Whitlock (UENO; GONÇALVES, 1994) pela contagem de ovos por gramas de fezes (OPG). Tem como finalidade estimar a quantidade de parasitos na infestação, que associado a coprocultura possibilita a identificação dos gêneros de parasitos presentes (EMBRAPA, 2010). As coletas realizadas durante o ECSMV tinham como objetivo o acompanhamento da estimativa de parasitos gastrointestinais em animais utilizados em experimentos. As amostras eram coletadas diretamente do reto dos cordeiros, sendo cerca de duas gramas acondicionadas em pequenos sacos plásticos de forma individual e identificados com o número do animal e eram processados em laboratório.

Nestes animais, que foram inoculados larvas infectantes de *H. contortus*, também eram realizadas as coletas de sangue da veia jugular para aferir a porcentagem de VG e juntamente com a observação da coloração da conjuntiva ocular utilizando a técnica FAMACHA (Figura 7A e 7B). Os resultados dessa avaliação associados aos de OPG e FAMACHA foram registrados para comparação

dos animais que participavam do projeto de pesquisa que determinava a resistência do indivíduo frente a infestação por *H. contortus*.

Figura 7. Coleta de sangue ovino (A) e execução da técnica FAMACHA (B).



Fonte: O autor

### 3 DISCUSSÃO

#### 3.1 Tristeza Parasitária Bovina

Com a significativa importância do Brasil no cenário mundial da produção de alimentos, a qual deve aumentar na decorrência dos anos (FAO, 2017), nos remete a pensar que haverá uma maior intensificação de produção e junto a ela soluções para diminuir as perdas produtivas e econômicas da atividade pecuária. Para o sucesso necessário desse aumento, a aliança entre genética, nutrição, reprodução e sanidade deve sempre andar em sincronia minimizando seus problemas individuais. Dentre as enfermidades que afetam a bovinocultura, problemas com as doenças parasitárias ganham destaque entre os maiores entraves responsáveis por atrasos em melhoramentos de rebanho, alto prejuízo econômico e por vezes apresentam dificuldades no controle dos surtos (PERRY; RANDOLPH, 1999). Isso tem total relevância especialmente quando o rebanho está exposto a doenças de surto agudo onde a intervenção clínica pode ser tardia e ocorre a morte do animal podendo o mesmo ser de alto valor genético.

No Brasil as doenças inflamatórias e parasitárias são as de maior ocorrência, entre elas a TPB que por possuir uma mortalidade elevada é um dos principais problemas sanitários de bovinos no RS (LUCENA et. al., 2010). Observando, durante o ECSMV, a procura dos produtores por soluções para prevenção, diagnóstico, formas de tratamento contra a TPB, confirmam a importância da enfermidade. No EEA Mercedes Sanidade Animal, a maioria dos casos diagnosticados é do complexo TPB, porém apenas 40% das amostras com o diagnóstico presuntivo são positivas (SARMIENTO; ZIMMER, 2010). Os dados citados concordam parcialmente com a experiência prévia no laboratório de parasitologia da Universidade Federal do Pampa Uruguaiana, que está em região similar a do EEA Mercedes, dos últimos cinco anos, onde cerca de 60% das amostras processadas tem como resultados positivos para TPB.

A TPB é um complexo composto por duas doenças, a anaplasmosose causada por uma *Rickettsia* da espécie *A. marginale* e a Babesiose, por dois protozoários das espécies *B. bovis* e *B. bigemina*. Ambos agentes tem como vetor o carrapato (FARIAS, 1995), porém na anaplasmosose o contágio também ocorre por fômites como agulhas ou através de insetos hematófagos, como os tabanídeos (SALA,



2013). Todos são intraeritrocitários obrigatórios dos bovinos e também apresentam semelhança em alguns sinais clínicos (KESSLER; SCHENK, 1998). Estes sinais apresentados não são exclusivos do complexo, podendo abranger diagnósticos diferenciais como a raiva, o botulismo, a leptospirose e intoxicações por algumas plantas tóxicas. Pelas características semelhantes dos agentes, principalmente na sintomatologia e seus possíveis diagnósticos diferenciais, a campo se torna difícil a diferenciação de qual agente está causando a doença na forma clínica, assim sendo indispensável a realização do diagnóstico laboratorial (SARMIENTO; ZIMMER, 2010). Confirmando o descrito pelo mesmo autor, houveram casos de pesquisas de hemoparasitos para diagnóstico de *causa mortis* e em grande parte dos casos a avaliação juntamente com o diagnóstico diferiam da suspeita principal.

A gravidade com que a enfermidade irá se manifestar dependerá de fatores como exposição prévia aos agentes, quantidade de inóculo e patogenicidade da amostra, pois mesmo sendo de espécies iguais existem variações entre elas. O entendimento sobre o ciclo biológico do *Rhipicephalus microplus* (carrapato do boi) é de fundamental importância, pois a presença dele é determinante na epidemiologia da TPB, principalmente nos casos de babesiose. Na Argentina, diferente do Brasil as infestações são distintas, pois há diversas áreas de erradicação do carrapato, aumentando as áreas de instabilidade enzoótica.

A forma de efetuar um planejamento de prevenção da doença e obter sucesso depende inteiramente do conhecimento da epidemiologia da enfermidade e boas práticas no momento do manejo junto a confirmação por diagnóstico laboratorial, pois é um dos maiores aliados para o êxito no controle, especialmente da dinâmica populacional do carrapato.

A consolidação da defesa buscada é dependente da imunidade inata somada a atuação dos mecanismos específicos de imunidade, agindo através de componentes humorais e celulares para a proteção (ARAÚJO; MADRUGA, 1998). Trazendo maior segurança na obtenção da imunidade, mantendo a quimioprofilaxia e imunização artificial apenas para manter um efeito sinérgico ou preventivo para caso não ocorra a imunização transmitida pelo *R. microplus* a campo (FARIAS, 1995).

Em casos de tratamento da doença com sua sintomatologia clínica, o sucesso dependerá do quão cedo o mesmo foi realizado e do reconhecimento do agente por

análise laboratorial, em casos mais graves o tratamento de suporte para reverter os sinais clínicos é recomendado (SACCO, 2002).

### 3.1.1 Babesiose bovina

A Babesiose é uma doença causada por protozoários do gênero *Babesia* sp., e está distribuída em vários locais onde possuem a presença do seu vetor, o carrapato. Várias espécies de babesias são conhecidas e foram isoladas no mundo, porém um maior enfoque é dado às espécies *B. bovis* e *B. bigemina*, por demonstrarem maior importância pelos prejuízos econômicos e produtivos para a bovinocultura gaúcha e também Argentina onde ocorre a presença de *R. microplus*. Diversos gêneros de carrapatos são vetores da enfermidade, porém para as duas espécies em questão o principal vetor é o *R. microplus* (BOCK et al., 2004). Este possui distribuição mundial em áreas tropicais e subtropicais, normalmente situadas entre os paralelos 32°N e 32°S, apresentando grande importância na epidemiologia da doença em regiões do Brasil situadas nessa posição geográfica (SACCO, 2002).

A *Babesia* spp. possui duas formas de reprodução, uma sexuada no carrapato e outra assexuada no seu hospedeiro vertebrado. O carrapato do boi efetua a parte parasitária de seu ciclo somente em um hospedeiro, a *Babesia* spp. têm como estratégia de sua perpetuação a infecção dos ovos do carrapato ainda dentro do sistema reprodutor da fêmea, assim após a oviposição as larvas e ninfas infectadas vão atuar como vetores da enfermidade, transmitindo-a aos bovinos. Levando em conta os conceitos da parasitologia podemos afirmar que as babesias são parasitos de carrapatos, pois são neles que ocorre a reprodução sexuada.

No momento que o carrapato efetua a hematofagia é liberada na circulação do bovino seus esporozoítos da babesia em questão que irão infectar as hemácias do hospedeiro, passando a trofozoítos. Após sofrerem divisão por fissão binária passam para a fase de merozoítos, que irão romper a célula para infectar uma nova hemácia. Durante o ato de hematofagia, o carrapato irá ser contaminado por gametócitos, forma da babesia. que efetua reprodução sexuada. No intestino do carrapato os gametas chamados corpos de raios fundem-se formando um zigoto móvel, referido por oocineto. Estes irão penetrar nas células epiteliais do intestino, onde o zigoto em divisão meiótica irá passar a cineto. O cineto através da hemolinfa se dissemina a órgãos do carrapato, dentre eles os ovários onde irá garantir o

contágio dos ovos. Paralelo a este, os cinetos sofrem fissão múltipla e invadem as glândulas salivares do carrapato, que em forma de esporoblasto ficam em dormência para o repasse sanguíneo (JALOVECKA et al., 2019). A diferença do ciclo das espécies de *B. bovis* e *B. bigemina*, ocorre no estágio do carrapato em que a *Babesia* spp. irá se desenvolver na glândula salivar, sendo em larva para *B. bovis* e ninfa e adulto para *B. bigemina* (FARIAS, 1995).

Em geral, os três agentes do complexo TPB possuem semelhança na sua sintomatologia clínica, porém não são patognomônicos da doença, sendo que febre, anemia, icterícia são sugestivos da enfermidade. Para infecções por *B. bigemina*, as mucosas irão se apresentar pálidas, podendo estar levemente ictéricas, a febre e anemia são bem demarcadas e apresenta quadro de hemoglobinúria. Em *B. bovis*, se demonstra de duas formas, uma aguda e outra superaguda. Sua sintomatologia é muito semelhante a apresentada no hemoparasito anterior, porém este causa uma modificação nas hemácias fazendo com que se acumulem em pequenos capilares diminuindo a oxigenação de tecidos podendo cursar com uma sintomatologia nervosa, semelhante a raiva. No quadro superagudo irá ocorrer uma congestão em mucosas, o mesmo ocorre em órgãos que confirmam a enfermidade na necropsia. É um quadro clínico rápido, visto que na maioria das vezes, dentro de pouco tempo que iniciam os sinais o animal vem a óbito (KESSLER; SCHENK, 1998). Os quadros clínicos acompanhados no EEA eram os referentes aos estágios iniciais na infecção experimental, porém devido ao acompanhamento nenhum animal veio a óbito, tampouco foram evidenciados os sinais neurológicos.

### **3.1.2 Anaplasmosose bovina**

A *Rickettsia A. marginale* é a causadora da anaplasmosose nos bovinos, que é uma doença hemolítica que juntamente com a babesiose traz grandes perdas as atividades da bovinocultura. Possui distribuição mundial em zonas tropicais e subtropicais, cepas isoladas no mundo todo apresentam variação genética e morfológica quando comparadas. Têm como vetores os carrapatos, insetos que praticam hematofagia e instrumentos contaminados, como as agulhas (FARIAS, 1995).

Dentro das diferentes cepas de *A. marginale* encontradas, foi possível concluir que o vetor *R. microplus* não demonstra real importância na sua

disseminação, pois mesmo necessitando do artrópode em parte do seu ciclo, efetua somente a contaminação via transmissão interstadial o que mostra importância somente em carrapatos com ciclo trioxeno, que não é o caso de *R. microplus*. Ainda estuda-se a possível relação de transmissão através do *R. microplus* e conclui-se que a transmissão de *A. marginale* é realizada de forma mecânica apenas pelos machos desta espécie e por insetos hematófagos e fômites contaminados (KOCAN et al., 2010). Corroborando com parte da hipótese do mesmo autor, o diagnóstico acompanhado na EEA referia-se a animais que recentemente haviam sido manejados para aplicação de uma vacina, o que é sugestivo da possível transmissão iatrogênica e período de incubação da anaplasrose.

Nas hemácias dos bovinos o *A. marginale* apresentam semelhanças em seu comportamento quando comparado ao da *Babesia* spp., porém diferindo quando saem da hemácia não ocorre o rompimento da mesma. Após invadirem as células por invaginação, é formado na margem da mesma o corpúsculo inicial, este que pode ser visualizado como um ponto azul na periferia da célula em microscopia óptica em lâmina corada por Giemsa ou panótico. Após divisões por fissão binária em até oito corpúsculos irão invadir novas células (FARIAS, 1995). As hemácias infectadas podem ser fagocitadas por células do sistema imune, assim causando anemia que varia entre graus leve e grave (KOCAN et al., 2010).

O ciclo do ou da *A. marginale* no carrapato apresenta semelhanças quando comparado as babesias, sendo que as hemácias infectadas são ingeridas no momento do repasto sanguíneo e as rickettsias colonizam as células intestinais, onde distribuem-se aos demais tecidos do carrapato inclusive paras as glândulas salivares. Como não há transmissão transovariana, ficam os machos de carrapatos como os possíveis transmissores, como descritos anteriormente.

A transmissão via insetos hematófagos, como exemplo do gênero *Tabanus* spp. ocorre de forma mecânica, onde as hemácias infectadas são transmitidas de um animal portador para um susceptível através da peça bucal do vetor, a transmissão ocorre dentro de duas horas, após isso as células podem secar assim não realizando a infecção. Já os fômites atuam de forma mecânica semelhante a transmissão por insetos hematófagos, porém os mesmos devem garantir que não ocorra o ressecamento das hemácias infectadas, ou seja, um curto espaço de tempo entre um animal ou outro, ocorre mais comumente através da utilização de agulhas compartilhadas, objetos utilizados em castração, descorna, tatuagens, dentre outros.

(SALA, 2013). Uma hipótese apresentada pelo grupo do INTA Mercedes era que as luvas de palpação para diagnóstico gestacional seriam um fator importante a ser estudado, pois em outras enfermidades são consideradas fator de risco (ALMEIDA, et al., 2013).

### **3.1.3 Diagnóstico**

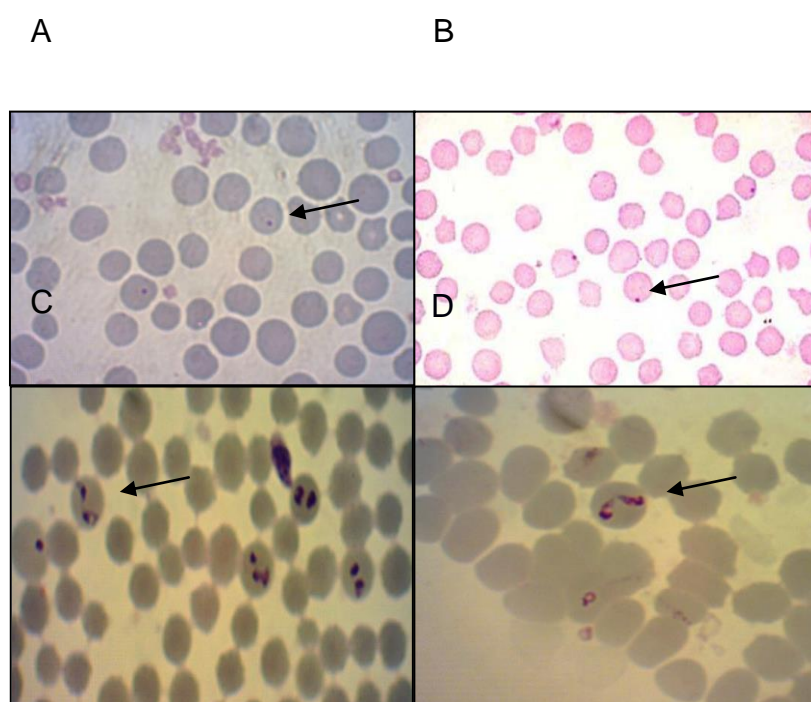
Para realizar o diagnóstico da TPB, informações obtidas na anamnese e da sintomatologia clínica são de extrema relevância no momento da investigação. Pode-se dividir o diagnóstico em epidemiológico, clínico e patológico. Deve-se ficar atento sobre um fator de extrema relevância no seu desenvolvimento, a classificação das áreas de ocorrência, como zonas de estabilidade enzoótica ou instabilidade enzoótica, esta mesma tem relação direta com a presença ou não do carrapato (VANZINI; RAMIREZ, 1994). Essas diferenças não são apenas geográficas, podem ser provocadas pelo produtor como, por exemplo, a introdução de lavouras que determinam alterações ambientais.

Em zonas de estabilidade enzoótica a doença de forma clínica da TPB ocorre com menor frequência, por seu maior tempo em contato com o vetor e conseqüentemente com o/os agentes. Já em zonas de instabilidade enzoótica as taxas de morbidade e mortalidade pela enfermidade são maiores, pois apresenta em épocas do ano ou por forma de manejo, a ausência ou uma considerável baixa na presença do carrapato, assim tendo pouco ou nenhum contato com os agentes da TPB nestes períodos (SACCO, 2002). Para ambos os casos, deve-se obter em uma anamnese detalhada informações como entrada de novos animais no rebanho, de onde os mesmos são trazidos (de local endêmico ou não), situação de como a propriedade efetua o manejo de controle do carrapato, mudança de lotes entre poteiros ou propriedades, ter conhecimento de fatores climáticos que caracterizam a região. Junto ao exame clínico, a coleta de amostras para exame laboratorial é realizada.

Na avaliação clínica, o conjunto de sinais observados podem se apresentar como: febre, palidez/icterícia, anemia, hemoglobinúria e sinais nervosos. Alguns sinais quando apresentados podem nos estimular a suspeitar mais de um agente do complexo do que de outro, porém para sua confirmação é necessário o diagnóstico laboratorial.

Para o diagnóstico laboratorial por método direto é realizado através da coleta de sangue total via veia jugular ou coccígea a qual possibilita mensurar e confirmar o grau de anemia do animal e obter amostra para o esfregaço sanguíneo. Através da realização de um esfregaço fino associado a uma gota espessa, podemos observar dois dos agentes da TPB, o *Anaplasma* spp. e a *B. bigemina*, bem como o *A. centrale*. Para confirmar a suspeita de *B. bovis*, somente amostras de sangue proveniente de vasos capilares coletados de extremidades como ponta de orelha ou extremidade de cauda permitem tal diagnóstico, devido ao tropismo por esses vasos que pode ser melhor interpretado pelo agrupamento dessa células sanguíneas nesse pequenos vasos, uma vez que perdem a flexibilidade e ficam retidas nesse trajeto sanguíneo. E, finalmente se tornará possível a visualização dos hemoparasitos com a coloração desses esfregaços através da técnica de Giemsa ou panótico rápido e visualização em microscopia óptica (SACCO, 2002) (Figura 8). Durante a leitura é possível realizar a contagem da estimativa de seu grau de parasitemia e identificar possíveis alterações típicas de casos de anemia como a anisocitose.

Figura 8- Visualização por microscopia óptica de esfregaço sanguíneo, células parasitadas com: *A. centrale* (A), *A. marginale* (B), *B. bovis* (C) e *B. bigemina* (D).



Fonte: o autor.  
experiência e

conhecimento do Médico Veterinário em torno dos assuntos epidemiológicos que



envolvem a doença e fatores que a influenciam apresenta grande relevância na confirmação de casos e no momento da tomada de decisões de como proceder com os mesmos. Opiniões e pontos de vista de quem realmente vive a rotina de onde está ocorrendo o caso devem ser sempre levado em consideração, e o diagnóstico laboratorial sempre deve ser buscado para a confirmação. O método direto de diagnóstico é realizado de forma rápida, barata e demonstra uma boa confiabilidade em resultado, sendo uma ferramenta de extrema importância para o médico veterinário.

Métodos indiretos também são utilizados, sendo os mais frequentes os testes sorológicos de ELISA e imunofluorescência, onde através do soro coletado do animal pode-se realizar a detecção da presença de anticorpos contra os agentes da doença (PERTILE, 2012).

O diagnóstico patológico consiste na análise das alterações em necropsia. De forma macroscópica é possível identificar palidez e/ou icterícia em mucosas e serosas, fígado, baço e rins apresentando congestão e aumento de volume, linfonodos entumecidos e escuros, vesícula biliar distendida com líquido espesso e grumoso, congestão cerebral com evidência de vasos, urina de cor escura avermelhada, cérebro cor de cereja (*B. bovis*). Todo o conjunto observado leva ao quadro da TPB, porém mesmo alguns agentes apresentando alterações próprias, não são patognomônicos para o mesmo, a visualização do agente em microscopia óptica é necessária para a confirmação do diagnóstico (FARIAS, 1995). Em caso de morte de animais sendo em surtos de doenças ou não, o médico veterinário deve ter como hábito no trabalho a realização da técnica, pois a mesma irá confirmar a causa da morte do animal e conseqüentemente da suspeita que apresentava. Como em muitos casos de TPB, a sua confirmação pode ser concluída por análise microscópica dos materiais obtidos, caso ainda não se conclua e possa se tratar de outras enfermidades, a obtenção de amostras e envio a outros laboratórios para posterior análise é necessário.

### **3.1.4 Controle e prevenção**

As formas de controle e prevenção da TPB caracterizam-se por cuidados baseados nos fatores epidemiológicos da doença, tendo como aliados aos manejos ferramentas como a quimioprofilaxia, premunicação e imunização. Situações que

podem ocorrer surtos da doença podendo ocorrer pela introdução de animais portadores crônicos de um dos agentes, com a presença do vetor ou seguido de manejo com a utilização de fômites que possam causar a transmissão se tratando da anaplasnose. Outra forma comum do surgimento destes surtos está associada a falha de manejo no controle ao carrapato, pois em muitos casos, especialmente na terceira geração há muito inóculo sendo veiculado pelos ácaros e o sistema imune não demonstra competência suficiente para evitar a alta taxa de infecção (FARIAS, 1995). Situações de manejo as quais se assemelham a estes exemplos predispoem a surtos com alta mortalidade de animais. Sendo assim o controle do carrapato é visto como uma das principais formas de prevenção.

Outra forma de prevenção é a quimioprofilaxia, com ingredientes ativos comerciais. O mesmo pode ser realizado com antibióticos da classe das tetraciclinas, protozoarídicidas como diacetato de diaminazeno e dipropionato de imidocarb que tem ação para ambos agentes etiológicos. Dentre estes, o mais utilizado para a prática da quimioprofilaxia é o dipropionato de imidocarb, inclusive essa informações estão em bula destes medicamentos. Estes são os mesmos princípios ativos utilizados para o tratamento curativo da doença respectivamente (SCHEFFER, 2013).

Considerando a utilização do imidocarb para a realização do manejo preventivo de um lote de animais que sofrerá uma mudança de potreiro, as aplicações devem ser estipuladas previamente conforme a indicação de dosagem informada pelo fabricante do produto, ou seja, se a dose curativa do dipropionato de imidocarb para a babesiose corresponde a 3 mg/Kg de peso corporal e para anaplasnose o dobro da mesma, para que fique hemoparasitos circulantes onde se realize uma estimulação da resposta imune do animal e o mesmo não demonstre sintomatologia clínica, esta aplicação é realizada com metade da dose terapêutica (SILVA et al., 2015). O período de aplicação parte do dia o qual os animais entrarão no novo potreiro, até o 5º dia inicial, deve ser realizado a aplicação de dose profilática para babesiose, onde a partir deste poderão surgir animais com sintomatologia clínica, os quais devem ser tratados com a dose terapêutica. Entre o 20º e 30º dia da transferência podem iniciar o surgimento de novos animais com sintomatologia clínica, onde a partir da visualização do primeiro animal que demonstre os sinais, deve-se efetuar a aplicação da dose profilática para anaplasnose em todo o rebanho, caso neste período não ocorra o mesmo não é



necessário. Estes intervalos entre dias de aplicação são realizados com base no período pré-patente de cada agente (FARIAS, 1995).

Em uma breve explicação, um conceito em comum é apresentado entre a premunição e a vacinação, o qual baseiam-se na inoculação de agentes da doença em animais livres para que ocorra o estímulo da resposta imune. Porém, melhor apresentando suas diferenças, a premunição em TPB é realizada através da coleta de sangue de um animal o qual é conhecido como portador crônico da doença, seguindo de posterior aplicação por via subcutânea em quantidades que variam de 3 a 5ml nos animais que se desejam realizar a imunização. A origem do animal doador é geralmente da própria propriedade, onde é utilizada cepa patogênica de campo e não é realizado um prévio monitoramento de outras doenças que o doador possa portar e possivelmente transmitir aos receptores. Após a aplicação, os animais devem ser diariamente monitorados onde os que apresentarem sinais clínicos devem ser tratados (KESSLER; SCHENK, 1998). Enquanto a vacinação utiliza de um conceito semelhante a premunição, porém em sua produção é utilizado cepas atenuadas de *B. bovis* e *B. bigemina*, sendo para anaplasrose isolado cepa de *A. centrale*, que não demonstra capacidade de gerar doença e expressa imunidade cruzada ao *A. marginale*. Em sua dose de aplicação é conhecido a quantidade de hemácias parasitadas que estão sendo inoculadas, em torno de  $1 \times 10^7$  de células com cada agente, com isso é possível estimar o tempo que pode-se iniciar quadros de sintomatologia clínica nos animais adultos não expostos naturalmente. Outro fator que gera segurança na aplicação deste imunógeno é que os animais antes de serem esplenectomizados e inoculados, passam por testes sorológicos onde garante que não sofreram contato com agentes de outras doenças que possam ser transmitidas pelo sangue.

Sua utilização é recomendada para animais de três a 10 meses, onde pode-se realizar um teste sorológico antes da aplicação que irá demonstrar se apresenta ou não a necessidade da imunização, para confirmar a efetividade nos 30 dias após vacinação pode ser realizado através de mesmo teste a verificação da presença de anticorpos contra os agentes, efetuando em 10% dos animais expostos, se o resultado indicar uma presença inferior a 75% de soropositivos uma segunda dose da mesma é indicada (INTA Mercedes, informação pessoal). A vacinação em adultos requer maiores cuidados, fêmeas prenhes não devem ser vacinadas, pois podem sofrer aborto. Em vacinação de adultos, principalmente em zonas de instabilidade

enzoótica, a partir do 6º dia da aplicação deve-se iniciar uma maior observação nestes animais, pois se tratando desta zona, há a possibilidade de indivíduos não terem entrado em contato com agentes, seja por pouca presença do vetor ou baixa infestação por babesias no momento do carrapateamento quando jovens.

Estudos ainda não concluídos no EEA Mercedes visam auxiliar e facilitar o manejo aos produtores que necessitam realizar a aplicação em adultos. Para uma efetiva prevenção do surgimento de surtos da TPB e menor ocorrência de aparecimento clínico em animais do rebanho, associando sempre a um correto manejo de controle do carrapato e tomando cuidados em manejos com fômites para evitar a contaminação mecânica. Das três formas citadas a que melhor demonstra resultados em estimulação de imunidade contra a doença e segurança na realização de manejo é a vacinação a partir de agentes atenuados.

O EEA Rafaela, localizado na província de Santa Fé na Argentina também produz o imunógeno, com as mesmas recomendações e nomenclatura do produzido no EEA Mercedes. A forma de produção para ambos é a mesma, porém no EEA Rafaela a replicação dos agentes atenuados é realizada *in vitro* através da multiplicação das cepas em cultivos celulares. Esta diferença permite uma maior obtenção de agentes, assim possibilitando um maior número de doses no momento da produção, quando comparado a replicação *in vivo*. Além da maior quantidade de doses outra vantagem é observada na replicação *in vitro*, a facilidade em produzir o imunógeno na forma congelada (INTA Mercedes, informação pessoal).

Na Argentina também é comercializado o imunógeno na forma congelada, o mesmo é produzido pelo laboratório particular Litoral Biológico, que denomina o imunógeno como Bío Jaja. Este é composto pelas mesmas cepas utilizadas na produção pelo INTA. Cada dose é composta por 0,5ml, sendo recomendada a aplicação via subcutânea, o descongelamento deve ser realizado com a imersão da palheta em água a 40°C, após o descongelamento a dose pode ser mantida na temperatura de 4 a 8°C por até 12 horas, não podendo ser congelada novamente. As recomendações de cuidados pós aplicação são as mesmas recomendadas pelo INTA, porém a Bío Jaja não é indicada a animais maiores de 10 meses de idade (LITORAL BIOLÓGICO, 2016).

A forma de produção do imunógeno congelado se diferencia em alguns pontos quando comparado ao resfriado. Para a produção é necessário um maior número de células parasitadas que irão compor a mistura, pois a dose é composta

por uma menor fração aplicável e no processo de congelamento ocorrem perdas de agentes, assim dificultando a replicação dos mesmos quando realizados utilizando terneiros esplenectomizados, sendo utilizada a multiplicação *in vitro*. Cada dose é composta por mais de  $1 \times 10^6$  células parasitadas para cada agente, o componente antimicrobiano é uma associação de penicilina e estreptomicina e na solução tampão utilizada junto a ela glicerol, que atua como crioprotetor celular. O congelamento é realizado de forma lenta, sendo que após envasado em palhetas de 0,5ml, é alocado em freezer com temperatura em torno de  $-20^{\circ}\text{C}$ , após sendo armazenado em botijões de nitrogênio líquido (INTA Mercedes, informação pessoal). O imunógeno na forma congelada demonstra vantagens quando comparado ao resfriado, a cada lote produzido é possível realizar testes de eficácia do mesmo que trazem uma maior confiabilidade e padronização do produto, o qual a formulação resfriada não possibilita pelo seu curto período de validade. Outra vantagem é o período indeterminado de armazenamento em botijão de nitrogênio, assim possibilitando ao produtor sua utilização conforme seu planejamento e necessidade.

O Uruguai é um país que também possui o imunógeno contra a TPB em forma comercial, sendo encontrado em formulação resfriada e congelada. Segundo Nari et al. (1979), no Uruguai se utilizava uma formulação resfriada que apresentava grandes diferenças quando comparadas as vistas na Argentina, onde sua produção utilizava como diluente sangue total apresentando hemácias parasitadas com cepa de *A. centrale* não quantificadas, antibiótico e sangue com cepa atenuada de *B. bigemina*, na quantidade de  $1 \times 10^7$  hemácias parasitadas, essa formulação correspondia a primeira aplicação do imunógeno. Para uma segunda aplicação era produzido com diluente sendo sangue com *A. centrale*, antibiótico e  $1 \times 10^7$  hemácias parasitadas com cepas de *B. bovis*, sendo aplicados 30 dias após a primeira.

O imunógeno resfriado encontrado hoje no Uruguai é produzido pelo DILAVE, sua forma de produção e recomendações é semelhante a visualizada na Argentina como a BABESAN. Cepas locais de *B. bovis* e *B. bigemina*, foram isoladas, purificadas e atenuadas, para as replicações também são utilizados terneiros esplenectomizados. No momento da produção se diferem as quantidades de hemácias parasitadas para cada agente, onde para *B. bovis* é utilizado  $1 \times 10^7$  hemácias parasitadas, para *B. bigemina*  $2 \times 10^5$  e para *A. centrale*  $1 \times 10^6$  (SOLARI; QUINTANA, 1994). Essa diferença pode ser explicada pela taxa de atenuação

verificada em cada cepa, onde é aferida por seu potencial de manifestar a doença após atenuada (INTA Mercedes, informação pessoal).

A formulação congelada chamada de HemoVacC que também é reproduzida no Uruguai pelo laboratório particular BioSur, na literatura não foi encontrada sua forma de produção, porém suas recomendações pós inoculação são as mesmas apresentadas pela Bío Jaja. A HemoVacC necessita um preparo prévio a aplicação além do seu descongelamento, apresenta-se em quatro tubos congelados onde um contém o diluente e os outros três correspondem as cepas, um tubo para cada agente. Pode ser encontrado em volumes para se realizar o preparo de 20, 40 e 80 doses, onde cada dose contém 2ml, após pronta a diluição, a mesma tem a durabilidade de seis horas mantida resfriada (BIO SUR, 2016).

Em comparação as duas formulações disponíveis no Uruguai, ambas demonstraram eficácia em sua utilização na prevenção da TPB, assim sendo amplamente recomendada sua utilização (MIRABELLES et al., 2018). Levando em consideração os parâmetros avaliados no EC SMV na produção e atuação dos imunógenos produzidos na Argentina e dos produzidos no Uruguai, é notável que ambos possuam grande difusão nos seus países tendo além de uma aceitabilidade pelos produtores rurais, contém uma eficácia desejada na imunização dos animais, sendo assim por base nos resultados e avaliações é comprovada a importância da existência dos imunógenos em áreas onde a doença mantém uma ocorrência enzoótica.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o período de realização do estágio foi possível conviver e observar diferentes áreas da sanidade animal, envolvendo atividades voltadas a diagnósticos e pesquisa. Esta experiência fez com que ficasse mais concreto o ponto de vista já construído durante a graduação, onde o diagnóstico é de fundamental importância para a tomada de decisões e solução de problemas, e a prevenção sim, é a forma mais eficaz e econômica para controlar e evitar surtos de doenças.

O enfoque do ECSMV foi dado ao setor de parasitologia, onde suas atividades giraram em torno do complexo da Tristeza Parasitária Bovina. É nítida a importância do complexo em meio às doenças parasitárias e seus prejuízos gerados na produção animal, o que confirma ser de fato o maior problema sanitário na bovinocultura. É notável a necessidade de maiores investimentos para o tema, pois o desenvolvimento de medidas profiláticas, em curto prazo, pode reduzir parte dos prejuízos causados pela TPB.

Uma importante ferramenta para o auxílio no controle desta enfermidade, e que tem um custo baixo frente aos prejuízos gerados pelo mesmo, é o imunógeno contra o complexo da TPB. O imunógeno é relativamente simples e demonstra boa eficácia frente à doença, podendo ser facilmente implementado nos protocolos sanitários de propriedades localizadas em zonas endêmicas.

A Argentina, assim como o Uruguai realizam a produção e utilização destes imunógenos, onde demonstram também um avançado conhecimento e investimentos no assunto. Na Argentina pesquisas voltadas a produção e melhorias do imunógeno são realizadas constantemente pelo INTA, visando sempre o aumento na eficácia no momento de sua utilização. Enquanto que no Brasil ainda é reduzida a busca para resolver tal problemática.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. L. et al. Herd-level risk factors for bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds from Southern Brazil. **Veterinary Science**, Porto Alegre, 2013.

AMARANTE, A. F. T.; Why is it important to correctly identify *Haemonchus* species? **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** (Online) vol. 20 no. 4, Jaboticabal, 2011.

ARAÚJO, F. R., Imunidade contra *Babesia* e *Anaplasma*. In: KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. 1 ed., Campo Grande, MS: EMBRAPA-CNPGC, p. 69-80, 1998.

BIO SUR. **HemoVacC**. Pando, 2016. Disponível em: <<https://www.biosur.com.uy/>>. Acessado em: 20 abr. 2019.

BOCK, R. et al. Babesiosis of cattle. **Parasitology**. v. 129, p. S247-S269, 2004.

EMBRAPA. Exames de OPG e Coprocultura para detecção de verminoses em ruminantes. **Embrapa pecuária Sul** - Soluções tecnológicas, Bagé, 2010. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/pecuaria-sul/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/1013/exames-de-opg-e-coprocultura-para-deteccao-de-verminoses-em-ruminantes>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

FAO. Representante da FAO Brasil apresenta cenário da demanda por alimentos. **FAO no Brasil**, 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/901168/>>. Acessado em: 23 mai. 2019.

FARBER, I. R. **Panorama de la ganadería en Argentina**. El Sur del Sur, 2019. Disponível em: <<https://surdelsur.com/es/ganaderia-argentina/>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

FARIAS, N. A. R. **Diagnóstico e Controle da Tristeza Parasitária Bovina**, 1º ed. São Paulo: Livraria e Editora Agropecuária, 1995.

FORMIGONI, I. **Comportado os preços do bezerro no país**. Farmnews, 2017. Disponível em: <<http://www.farmnews.com.br/mercado/precos-do-bezerro-2/>>. Acessado em: 06 mar. 2019.

\_\_\_\_\_. **Maiores rebanhos bovinos em 2018 por país produtor**. Farmnews, 2018. Disponível em: <<http://www.farmnews.com.br/historias/maiores-rebanhos-mundiais/>>. Acessado em: 06 mar. 2019.

IBGE. Rebanho de bovinos tem maior expansão da série histórica. **IBGE-Estatísticas Econômicas**, 2017. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/16994-rebanho-de-bovinos-tem-maior-expansao-da-serie-historica>>. Acessado em: 05 mar. 2019.

MARTINEZ, B. A. F. et al. **Notificações de doenças de bovinos recebidas pelo Serviço Veterinário Oficial do Rio Grande do Sul nos anos de 2011 e 2012**. INFORMATIVO TÉCNICO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, n.12, RS, 2013. Disponível em: <<https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201612/02101310-inftec-45-notif-doencas-bovinos-em-2011-e-2012.pdf>>. Acessado em: 22 mai. 2019.

JALOVECKA, M. et al. *Babesia* Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. **Trends in Parasitology**, Vol. xx, No. yy, 2019

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. 1 ed., Campo Grande, MS: **EMBRAPA-CNPGC**, 1998.

KOCAN, K. M.; et. al. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 95-107, 2010.

LITORAL BIOLÓGICO. **Vacuna para la prevención la Tristeza de los bovinos.**

Chaco, 2016. Disponible em: <<http://litoralbiologicos.com.ar/vacuna-babesiosis-anaplasmosis/>>. Acessado em: 25 abr. 2019.

LUCENA, R. B. et al. Doenças de bovinos no sul do Brasil: 6.706 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 5, p. 428-434, 2010.

MIRABELLES, C.; et al. Eficacia de dos vacunas, congelada y refrigerada, contra la tristeza parasitaria bovina. **Veterinaria**, Montevideo), v. 54, nº 209-2, 2018.

MOLENTO, M. B., et. al. Famacha guide as an individual clinic parameter for *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n4, p.1139-1145, 2004.

NARI, A.; et. al. Hemovacuna para el control de *Babesia* spp. y *Anaplasma marginale* en el Uruguay. **Veterinaria**, Montevideo, nº15, p.137-148, 1979.

PERRY, B.D.; RANDOLPH, T. F. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. **Veterinary Parasitology**. Nairobi, n 84, p. 145-168, 1999.

PERTILE, C. **Elaboración de hemovacunas refrigerada para Babesiosis y Anaplasmosis bovina**. Corrientes: UNNE Facultad de ciencias veterinaria, 2012.

SACCO, A. M. S. Controle/Profilaxia da Tristeza Parasitária Bovina. Comunicado Técnico, Bagé, RS, **Embrapa Pecuária Sul**, v. 38, n 1, 2002.

SALA, J. M. **Transmisión Transplacentaria de *Anaplasma marginale* en Bovinos Nativos en Noreste Argentino**. Esperanza, Santa Fe, AR: Universidad Nacional del Litoral Facultad de Agronomía y Veterinaria, 2013.

SARMIENTO, N. F.; ZIMMER, P. **Casística de la babesiosis y anaplasmosis bovina, 2009-2010**. INTA – Noticias y comentarios, Mercedes, nº 456, Marzo, 2010.



Disponível em: <[https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-n\\_456.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-n_456.pdf)>. Acesso em: 25 abr. 2019.

SCHEFFER, R. F. **Quimioprofilaxia e Desenvolvimento de Imunidade para Tristeza Parasitária Bovina**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Medicina Veterinária, 2013.

SILVA, S. S.; et al. Assessing different chemoprophylactic protocols against bovine tickborne diseases and their influence on the weight gain of calves. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 2611-2618, 2015.

SOLARI, M. A., QUINTANA, S. Epidemiología y prevención de los Hemoparasitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en el Uruguay. In: Ed. Nari & Fiel, **Enfermedades Parasitarias de importancia económica en Bovinos: Bases epidemiológicas para su prevención y control**. Hemisferio Sur, Montevideo, UY, 1994.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: Uma introdução**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico de helmintoses de ruminantes**, 1º ed., Japão; Japan International Cooperation Agency, 1994.

VANZINI, V. R.; RAMIREZ, L. M. **Babesiosis y Anaplasmosis Bovina Diagnostico, Epidemiologia y Control**. INTA, Mercedes, 1994.

## ANEXO 1 - Certificado de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária realizado no Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria.



Mercedes, Corrientes 20 de mayo de 2019

A quien corresponda:

Certificamos que Luiz Felipe da Silva Gemelli ha realizado una pasantía de capacitación en el área de Sanidad animal de INTA EEA Mercedes durante 80 días, desde el 25 de febrero al 20 de mayo de 2019.

La capacitación fue dirigida hacia el manejo de instrumental y equipamiento, disposición de áreas del laboratorio, gestión de calidad y bioseguridad, conocimiento y desarrollo de técnicas para el diagnóstico de enfermedades venéreas, hemoparásitos, parasitología, Brucelosis, diagnóstico citológico y hemograma, como también salidas al campo para toma de muestras y realización de necropsias y producción de hemovacuna contra babesiosis y anaplasmosis bovina.

Durante la pasantía demostró interés, excelente predisposición y desempeño sobresaliente de las tareas.

Quedamos a disposición en caso de necesitar referencias de la profesional.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a horizontal line crossing through them.

M.V Carla N. Pertile  
Área Hemoparásitos, Sanidad Animal.  
EEA INTA Mercedes Corrientes

A handwritten signature in black ink, featuring a series of sharp, upward-pointing strokes followed by a horizontal line.

M.V Néstor F. Sarmiento  
Jefe de Sanidad Animal  
EEA INTA Mercedes Corrientes