

Tristeza Parasitária Bovina - Medidas de controle atuais

*Lenita Ramires dos Santos
Emanuelle Baldo Gaspar
Magda Vieira Benavides
Gustavo Trentin*

INTRODUÇÃO

Embora diversas riquetsioses, viroses e parasitoses sejam transmitidas por carrapatos, tanto para o homem quanto para os animais domésticos, pode-se considerar que a tristeza parasitária bovina (TPB) é a doença transmitida por carrapatos de maior importância econômica para a pecuária. No Brasil e em outros países do Cone Sul, dá-se o nome de TPB ao complexo de doenças causado por um ou mais dos seguintes agentes infecciosos: os protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e a riquetsia *Anaplasma marginale*.

As babesioses e a anaplasmose são tratadas dentro do mesmo complexo de doenças por terem em comum diversas características. Todos os agentes etiológicos são parasitas intracelulares obrigatórios e infectam hemácias. Assim, os sintomas das infecções pelos três agentes são similares devido à destruição destas células. Além disso, todos os agentes são transmitidos principalmente por carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e a infecção concomitante por dois ou três agentes é comum.

O tratamento é outro ponto em comum entre estas doenças. Embora a anaplasmo-se possa ser tratada especificamente com antibióticos da classe das tetraciclina e as babesias com diaceturato de diminazeno, na ausência de um diagnóstico definitivo que diferencie o agente etiológico, o dipropionato de imidocarb pode ser a droga de escolha. Este medicamento age tanto contra as babesias, quanto contra *A. marginale*, embora a dosagem efetiva contra a anaplasmo-se seja duas vezes e meia maior que a utilizada para tratar exclusivamente a babesiose.

EPIDEMIOLOGIA

O conhecimento da epidemiologia destas doenças é fundamental para nortear o controle de TPB baseado no controle do vetor¹. Três situações epidemiológicas distintas para as babesioses e a anaplasmose podem ser observadas, e estão intimamente relacionadas à distribuição geográfica do vetor, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A ocorrência de babesiose está limitada a áreas onde o carrapato é encontrado, o que se dá entre os paralelos 32°N e 32°S. Já a anaplasmose pode ocorrer em áreas livres de carrapato, pois também pode ser transmitida mecanicamente por moscas hematófagas e fômites contaminados.

As três situações epidemiológicas possíveis são:

- 1) **Áreas livres:** áreas sem a ocorrência do carrapato *R. (B.) microplus*, ao norte do paralelo 32°N ou ao sul do paralelo 32°S. Ainda, regiões de elevada altitude, onde o desenvolvimento do vetor é limitado pelo frio, podem ser consideradas áreas livres.
- 2) **Instabilidade enzoótica:** áreas próximas aos paralelos 32°N e 32°S, conhecidas como zonas marginais. No Brasil, o sul do Rio Grande do Sul encontra-se nesta condição. Especial atenção deve ser dada às zonas marginais, onde ocorre interrupção do ciclo do carrapato durante o inverno e os animais nem sempre são naturalmente “desafiados²” com os agentes da TPB antes dos nove meses de idade. Nas áreas marginais é comum que menos de 75% dos animais sejam infectados até esta idade (Mahoney; Ross, 1972), e há alto risco de surtos de TPB devido ao número insuficiente de animais protegidos por terem entrado previamente em contato com os agentes causais.
- 3) **Estabilidade enzoótica:** ocorre também entre os paralelos 32°N e 32°S, mas fora das zonas marginais. Nestas áreas de estabilidade, normalmente, mais de 75% dos animais são expostos aos agentes de TPB antes dos nove meses de idade, e o risco de surtos é mínimo (Mahoney; Ross, 1972).

A maior parte do território brasileiro encontra-se na situação de estabilidade enzoótica, porém, deve-se considerar que estas situações epidemiológicas não são absolutas. Mesmo em áreas de estabilidade, o tratamento intensivo com carrapaticida ou o uso de práticas de manejo que favoreçam a erradicação do carrapato, como, por exemplo, a interação lavoura-pecuária, podem gerar situações de instabilidade e não imunização adequada dos animais por falta de desafio.

Além disso, no sertão nordestino, situações de instabilidade enzoótica também podem ocorrer (Santos et al., 2017). Diferentemente do que acontece no Rio Grande do Sul, o Nordeste não se encontra em uma zona marginal, mas períodos prolongados de seca também interferem no desenvolvimento do carrapato e podem levar à interrupção do ciclo de transmissão dos agentes de TPB deixando os animais mais susceptíveis.

CONTROLE DE TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA

A forma de controle ideal de TPB seria a vacinação. Porém, atualmente, a disponibilidade da vacina viva atenuada contra TPB é bastante limitada. A produção desta vacina é bastante complexa e envolve o uso de animais. No Brasil, só tem sido feita sob a forma

¹Vetor: todo ser vivo capaz de transmitir um agente infectante. Para a TPB o vetor é o carrapato do boi.

²Desafiado: exposição dos animais a agentes causais de doenças.

refrigerada e, portanto, apenas sob encomenda, além disso, a forma refrigerada tem a desvantagem extra de não ter os lotes testados, pois a validade é muito curta. Assim, a forma de controle primordial contra este complexo de doenças está intimamente relacionada ao controle do carrapato.

Para que decisões corretas sejam tomadas para um efetivo controle da TPB é necessário um conhecimento mínimo da imunopatogenia da doença, uma vez que os procedimentos a serem adotados podem parecer, a primeira vista, paradoxais. Se, por um lado, o controle do vetor é necessário para que a inoculação de *Babesia* sp. ou *A. marginale* não seja excessiva, expondo os animais ao risco de desenvolvimento da doença clínica, a erradicação do carrapato não é desejada em suas áreas de ocorrência natural, pois o desenvolvimento e a manutenção da imunidade depende da inoculação mais ou menos constante de *Babesia* spp. e *A. marginale*. A este processo de manutenção da imunidade por reinfecção continuada dá-se o nome técnico de “imunidade concomitante”, que é fundamental para que a forma clínica da doença não ocorra.

É importante mencionar que, nas áreas situadas entre os paralelos 32°N e 32°S, fora das zonas marginais, pela situação de estabilidade, os surtos normalmente não ocorrem. Nestes locais, a erradicação do carrapato é contraindicada, pois, nas propriedades submetidas à erradicação, apesar de não haver surtos por ausência de infecção com os agentes de TPB enquanto o rebanho permanecer sem a inclusão de novos animais, os bovinos estarão completamente sensíveis a desenvolver sintomatologia clínica da TPB. Caso os animais entrem em contato com animais infestados por carrapato, o risco de surtos de infecção aos agentes da tristeza parasitária bovina será muito alto. Por outro lado, animais criados em áreas livres, quando vendidos já adultos para propriedades com ocorrência de carrapatos, provavelmente adoecerão, com elevado risco de morte.

Atenção especial deve ser dada às propriedades de gado leiteiro, uma vez que muitas são livres do carrapato, não necessariamente apenas pelo tratamento intensivo com carapaticidas, mas também devido a práticas de manejo que contribuem para a progressiva “limpeza das pastagens”, no que diz respeito aos carrapatos, ou ainda pela criação das vacas confinadas. As vacas sem contato com carrapatos, e, portanto, com os agentes de TPB, não têm anticorpos contra estes patógenos e, portanto, o colostro não é capaz de proteger as bezerras, que, apesar de mais resistentes, podem sucumbir a uma carga alta de parasitos. Nas propriedades leiteiras é comum animais adoecerem por anaplasmose (em algumas regiões, conhecida como “amarelão” devido à icterícia) uma vez que os animais não estão imunes, por não terem contato com carrapatos, mas podem se infectar com *Anaplasma* por meio da picada de moscas hematófagas. Além disso, nas propriedades leiteiras é comum a movimentação de animais entre áreas livres e áreas de ocorrência de carrapato. Atenção especial deve ser dada a estes casos, para a correta imunização dos animais antes da entrada no rebanho.

Assim, para controlar efetivamente a TPB, deve-se primar por encontrar um equilíbrio, no qual o controle de carrapatos seja realizado, mas não tão intenso, de modo a permitir a inoculação de pequenas quantidades dos agentes de TPB nos animais.

Outro aspecto bem interessante da TPB é que, ao contrário do que acontece em outras doenças, animais jovens são mais resistentes que adultos. Esta maior resistência não é devida apenas aos anticorpos maternos que os animais jovens recebem no colostro, embora a imunidade passiva recebida da mãe possa auxiliar no controle da infecção. A maior resistência dos animais jovens persiste, porém, além do período de duração dos anticorpos ingeridos com o colostro (Goff et al., 2010).

Existem diferenças expressivas na imunidade de animais jovens em relação à dos adultos (Brown et al., 2006) que contribuem para a maior resistência dos bezerros à TPB. Os picos de produção de transcritos de IL-12 e IFN- γ ocorrem três dias mais cedo nos animais jovens, em relação aos mais velhos, sendo que o pico de IFN- γ sérico nos bezerros ocorre no sexto dia pós infecção, enquanto que nos animais mais velhos ocorre entre 11 e 13 dias. Ademais, iNOS (óxido nítrico sintase indutível) só foi detectado nos bezerros e a produção de óxido nítrico (NO) foi mais inicial e mais intensa quando macrófagos esplênicos de bezerros foram infectados com *B. bovis*, em comparação aos macrófagos de animais mais velhos (Goff et al., 2010).

Para que um animal se torne imune sem apresentar sintomatologia clínica é necessário que tenha tido contato com o parasita antes dos nove meses de idade. Considerando o rebanho como um todo, isso se dá quando o carrapato é encontrado mais ou menos constantemente ao longo do ano, conforme ocorre nas situações de estabilidade enzoótica. Já nas áreas de instabilidade, o número de carrapatos é flutuante, a inoculação não é constante e muitos animais só se infectam tardiamente, quando a infecção pode ser letal (Mahoney, 1969).

Nos animais jovens, após um curto período de parasitemia³, estes se recuperam naturalmente, mas, ao que parece, a infecção persiste por longos períodos de forma branda o suficiente para não causar a doença e, ao mesmo tempo, forte o suficiente para estimular o sistema imunológico do animal evitando o aparecimento da doença. Este conhecimento é importante, pois, na ausência da vacina, para que se evitem os surtos, os animais devem ser naturalmente expostos aos carrapatos.

É importante que se saiba que o controle da TPB depende primordialmente do controle do carrapato, mas não de sua erradicação. Outras estratégias específicas para o controle da TPB que podem ser usadas são a vacinação, a pré-imunização e a quimioprofilaxia.

CONTROLE DO CARRAPATO EM ZONAS MARGINAIS

Enquanto que, em áreas tropicais, o carrapato desenvolve quatro gerações por ano e bovinos são encontrados em diferentes níveis de infestação ao longo do ano, em áreas marginais, como no sul do Rio Grande do Sul, o carrapato desenvolve três gerações ao ano: na primavera, no verão e no outono. No inverno, devido ao frio intenso, o carrapato não desenvolve seu ciclo. Assim, o primeiro ciclo, da primavera, tem menor população de carrapatos e esta população vai aumentando até seu ápice, no outono (Figura 1). Na região sul, os surtos de TPB normalmente ocorrem no verão e outono, coincidente com as maiores infestações por carrapato.

Desta forma, o ideal é que durante a primavera se inicie o controle do carrapato, pois, nesta época, tanto a população de carrapatos no animal quanto na pastagem ainda é pequena. Os bezerros devem ser expostos ao carrapato, para garantir que a maioria dos animais entre em contato, ainda jovens, com *Babesia* e *Anaplasma*, quando são mais resistentes.

No Sul do Brasil, a estação de nascimento, concentrada principalmente na primavera, coincide com o aumento de disponibilidade forrageira e também com a primeira geração de carrapatos, fato altamente desejável, pois assim os bezerros entram em contato com os carrapatos quando a população destes parasitas é pequena. Expor os bezerros à infestação branda com carrapatos é o ponto chave para evitar surtos de TPB quando estes se tornarem adultos.

³Parasitemia: presença de parasitos vivos no sangue circulante em um ser vivo.

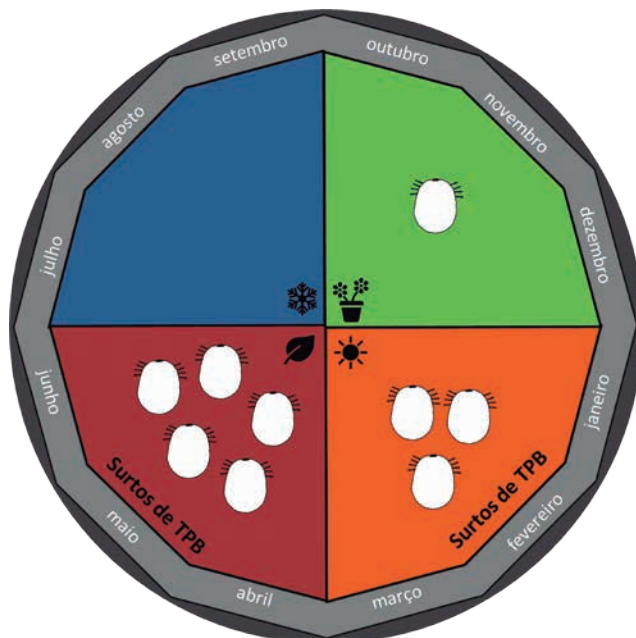


Figura 1. Diagrama das três gerações de carrapatos em um ciclo de um ano, na região sul do Rio Grande do Sul: Primeira geração na primavera (verde); segunda geração no verão (laranja); terceira geração no outono (marrom).

Os bovinos adultos também necessitam de pelo menos um contato anual com o carrapato, pois a manutenção da imunidade depende de reinfecções continuadas, o que também deve preferencialmente ocorrer na primavera, quando a infestação por carrapatos é menos intensa.

Na realidade, em zonas marginais, a primavera é uma estação estratégica para o controle de TPB, pois nesta estação é possível permitir uma exposição leve a moderada aos carrapatos. Desde que primeiras larvas sobem nos animais, até que elas se tornem adultas, leva um período de 18 a 24 dias, o que significa que quando o carrapato é facilmente visível (pelo tamanho das teleóginas⁴), já faz um tempo que se iniciou a infestação. Assim, o primeiro tratamento com carrapaticida deve ser iniciado quando as primeiras teleóginas são observadas na primavera, ainda na primeira geração de carrapatos.

O descuido com o tratamento nesta estação do ano pode levar à maior contaminação das pastagens e maior carga parasitária dos carrapatos e agentes da TPB nas estações seguintes.

As fêmeas de carrapato adultas e ingurgitadas, por serem grandes, são facilmente visualizadas, enquanto que as formas juvenis⁵ e os machos são menores e ficam sob a pelagem, só sendo visualizados por um observador atento e preparado para a identificação dos mesmos (Figura 2). É importante salientar este ponto, pois, tanto *B. bovis* quanto *B. bigemina* são transmitidas por fases iniciais do ciclo do carrapato. Frequentemente

⁴Fêmeas ingurgitadas: cheias de sangue e ovos; de tamanho grande e, portanto, facilmente observadas.

⁵Formas juvenis do carrapato: larvas, ninfas e metaninfas.



Figura 2. Exemplares do carrapato-do-boi *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **(A)** Fêmeas ingurgitadas. **(B)** Larvas. Notar o tamanho diminuto da larva (seta) em relação à grama, o que dificulta sua visualização nos animais. Acervo de: Marcos Valério Garcia.

produtores relatam a perda de animais por TPB “sem” que estes estejam supostamente “carrapateados”⁶. Na verdade, há carrapatos nos animais, mas nas formas juvenis, são difíceis de visualizar. Popularmente, as formas juvenis são conhecidas como “carrapato miudinho” ou “carrapato vermelhinho”, mas não são espécies distintas do vetor, apenas diferentes fases do mesmo carrapato.

Embora bastante divulgado, atualmente considera-se que o uso de tratamentos carrapaticidas estratégicos, com datas fixas não é a melhor opção de manejo. O ideal é se considerar caso a caso, cada propriedade isoladamente, pois a presença de carrapatos nos animais está condicionada tanto a condições meteorológicas quanto ao microambiente fornecido por outros fatores, tais como o tipo de forragem ou a altura desta.

Baixas temperaturas interferem tanto na sobrevivência dos carrapatos quanto em seus parâmetros reprodutivos (Short et al., 1989; Davey et al., 1991; Esteves et al., 2015). No frio, os ovos de carrapatos podem demorar mais tempo para eclodir que o usual (Short et al., 1989), postergando a liberação das larvas para uma época do ano com temperaturas mais favoráveis ao seu desenvolvimento. O frio intenso e prolongado é a razão pela qual a população de carrapatos na pastagem é drasticamente reduzida no inverno da região Sul do Brasil, e os bovinos ficam temporariamente livres de carrapatos.

Além das condições meteorológicas, ao se fazer um diagnóstico do problema com carrapatos na propriedade, deve-se levar em consideração as raças criadas e aspectos do manejo dos animais, tais como, número de tratamentos carrapaticidas, ciclo de produção na propriedade (cria, recria, engorda), tipo de pastagem utilizada, rotação com outras culturas, uso de diferimento⁷ de pastagem, entre outros.

⁶Carrapateados: animais com parasitismo pelo carrapato.

⁷Diferimento: O diferimento de pastagens, vedação ou produção de feno em pé pode ser entendido como uma estratégia de manejo que consiste em selecionar determinadas áreas da propriedade e excluí-las do pastejo, garantindo acúmulo de forragem para ser pastejada durante o período de escassez, minimizando os efeitos da sazonalidade de produção de forragem (Santos et al., 2009).

No Sul do Brasil, muito se tem comentado sobre os efeitos do aquecimento global, o que, pelo menos em teoria, poderia ter por consequência a não interrupção do ciclo do carrapato no inverno. Assim, haveria a passagem para o *status* epidemiologicamente estável para TPB, ou seja, haveria quatro gerações de carrapato por ano. Porém, se forem considerados os últimos 50 anos, o que se tem observado de concreto é uma elevação nos extremos das temperaturas máximas e mínimas diárias, com maior aumento nas temperaturas mínimas. Embora seja comentado por produtores pela observação empírica, ainda não há informações científicas de como o aquecimento do ambiente está, de fato, afetando o ciclo do carrapato.

Além disso, o uso de datas fixas para o tratamento tem eficiência reduzida quando consideramos que os fenômenos atmosféricos e oceânicos de “La niña” e “El niño” podem levar a profundas anomalias nas temperaturas e índices de precipitação.

Além da temperatura, a umidade também é bastante importante no desenvolvimento do carrapato, sendo o carrapato-do-boi bastante sensível ao dessecação (Davey et al., 1991). Esta é a razão pela qual algumas áreas do sertão do Nordeste também sejam consideradas como de instabilidade enzoótica. Neste caso, também se deve primar por permitir uma leve infestação dos bezerros, embora as épocas do ano variem em relação ao que acontece no Sul.

A frequência do tratamento deve ser determinada por propriedade, pois será dependente do grau de contaminação das pastagens e do efeito residual do produto. É sempre importante a recomendação técnica do médico-veterinário e a escolha da base química deve sempre estar pautada no exame de biocarrapaticidograma⁸.

QUIMIOPROFILAXIA

O princípio da quimioprofilaxia é tratar os animais antes da exposição ao carrapato/patógenos ou adoecimento. Os animais “naïve” (ou seja, animais que nunca tiveram contato com os agentes causadores da TPB) são tratados e expostos aos carrapatos para que, conforme diminua a concentração da droga, o animal, gradativamente, vá tendo contato com uma quantidade crescente de carrapatos contaminados com *Babesia* e/ou *Anaplasma*, desenvolvendo assim sua imunidade (Figura 3).

Conforme diminui a concentração da droga (linha azul), aplicada por via injetável, os animais são gradativamente expostos à infestação pelo carrapato e ocorre o desenvolvimento da imunidade (linha vermelha). Baseado em Sacco (2002).

Este método consiste na aplicação de imidocarb, na dose de 3 mg/kg (1 mL para cada 40 kg), conforme recomendação do fabricante. O ideal é ter um acompanhamento veterinário, no qual seja realizado o diagnóstico parasitológico (esfregaços sanguíneos) para ter certeza de que os animais se infectaram, pois, sem infecção, não estarão protegidos.

Independentemente de qual agente causador, deve-se ficar atento ao aparecimento de sintomatologia, para que uma segunda dose seja usada, caso necessário.

É um método que carece de maiores comprovações na literatura e que tem eficiência restrita, pois, mesmo submetendo os animais à infestação progressiva pelo carrapato, a

⁸Biocarrapaticidograma: O Biocarrapaticidograma é um teste para conhecer a sensibilidade da população de carrapatos presentes nas propriedades rurais aos carrapaticidas convencionais usados em banho de imersão e/ou aspersão, revelando a eficácia da base química usada na propriedade, indicando se há processo de resistência dos carrapatos aos produtos em uso nas propriedades para seu controle.

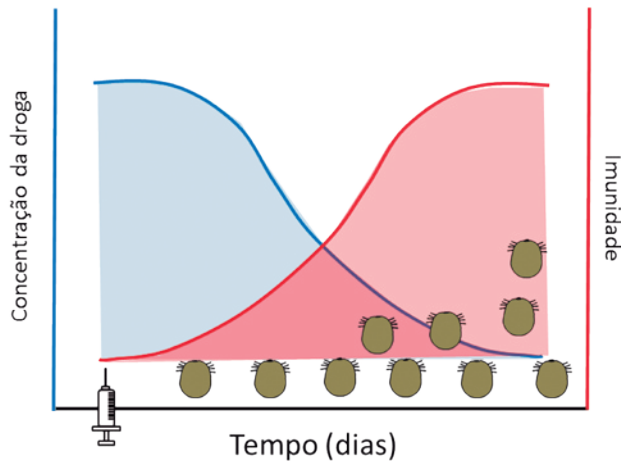


Figura 3. Diagrama ilustrativo do processo de quimioprofilaxia.

taxa de inoculação com *Babesia* e *Anaplasma* pode ser insuficiente para a imunização (muito baixa) ou alta o suficiente para que os animais adoçam, mesmo sob efeito da droga. É importante salientar que a quimioprofilaxia não possui a mesma função da vacina, pois não garante a infecção.

Quando o imidocarb é fornecido aos animais a cada 28 dias, como fazem alguns produtores, não ocorre a quimioprofilaxia, pois a infecção não se estabelece e os animais não se tornam imunes. Esta estratégia de manter os animais continuamente tratados pode ser usada para animais de alto valor zootécnico, quando provenientes de áreas livres de carrapatos.

Em áreas de instabilidade enzoótica, mesmo tomando-se todos os cuidados acima, casos isolados de TPB ainda podem ocorrer. Analisando-se particularmente o problema no estado do Rio Grande do Sul, o risco de surtos aumenta pelo fato de que boa parte dos animais criados tem sangue taurino (europeu) e são mais sensíveis à TPB que os zebuínos (Bock et al., 2004); o mesmo ocorre em propriedades leiteiras, que, geralmente, mantêm animais com elevado grau de sangue taurino.

Quando casos isolados ocorrem, o tratamento específico aliado à terapia de suporte (soro, hepatoprotetores e, eventualmente, transfusão sanguínea) tem bom efeito curativo, desde que os animais sejam tratados a tempo. É importante tratar os animais no local onde eles estejam, pois a simples movimentação dos mesmos até os centros de manejo pode levar à morte, já que, em alguns casos, os animais já estão com anemia bastante pronunciada.

O controle da tristeza parasitária bovina está intimamente associado ao controle de seu vetor, o carrapato do boi, *R. (B.) microplus*. Os níveis de infestação dos bovinos por este vetor pode resultar em surtos, quando as infestações são ausentes, muito brandas ou elevadas, ou em sucesso no controle da TPB, quando as infestações são moderadas.

Na falta de uma vacina, métodos de pré-imunização e quimioprofilaxia são opções para minimizar surtos de TPB quando o manejo do carrapato não propicia condições de infestações moderadas.

PRÉ-IMUNIZAÇÃO E VACINAÇÃO

Tanto a pré-imunização quanto a vacinação são baseadas na imunidade de longo prazo induzida tanto pelo contato prévio com cepas virulentas das babesias ou de *A. marginale*, no caso da pré-imunização, quanto com cepas vacinais/atenuadas de babesias ou de *A. centrale*, no caso da vacinação.

Na pré-imunização, coleta-se sangue parasitado de um animal doador e este sangue é passado para o animal receptor, após um período de “atenuação” em geladeira por 24 horas. Apesar de este método ser eficaz na prevenção de TPB, deve ser realizado com muita parcimônia, pois as cepas inoculadas são virulentas, podendo causar a doença no animal receptor, demandando tratamento. Além disso, se o animal doador não for testado, este poderá ser um disseminador de outras doenças veiculadas pelo sangue, para o rebanho.

Cuidado extremo deve ser tomado com os animais receptores no monitoramento dos sintomas. O tratamento com drogas babesicidas ou anaplasmicidas pode ser necessário para não se perder animais por TPB, mas pode dificultar o estabelecimento da imunidade.

Já a vacinação é feita com cepas atenuadas, representando um risco de doença clínica bem menor. Além disso, apesar da vacina ser produzida em bovinos, estes passam por um extremo controle com relação à infecção por outros agentes causadores de doenças, para evitar sua transmissão.

Tanto a pré-imunização quanto a vacinação devem ser realizadas antes dos 9 meses de idade, quando os animais são mais resistentes. Vacas prenhes não devem ser vacinadas, pois o risco de aborto é alto.

A BUSCA POR UMA NOVA VACINA CONTRA TPB

É amplamente mencionado na literatura que a prevenção da TPB pela vacinação é a melhor forma de controle deste complexo de doenças. Entretanto, atualmente, o Brasil dispõe de apenas uma vacina licenciada, a qual é vendida refrigerada e, apenas, mediante encomenda. Esta vacina tem como base microrganismos vivos – cepa *A. centrale* para imunização contra *A. marginale* e cepas atenuadas de *B. bovis* e *B. bigemina*. Alguns países ainda fazem uso de preparações semelhantes – Austrália, Israel, alguns países da África e da América do Sul, podem ser citados como exemplo (Bell-Sakyi et al., 2015).

Vacinas vivas são extremamente eficientes em induzir imunidade, porém, para que façam efeito, têm que se multiplicar no indivíduo inoculado. No caso particular da vacina citada no parágrafo anterior, ainda se agregam outros inconvenientes, como a necessidade da manutenção em nitrogênio líquido, descongelamento rápido em banho-maria, quando do uso das cepas congeladas, ou vida de prateleira curtíssima e impossibilidade de teste das partidas de vacinas, no caso da refrigerada. Soma-se a estas desvantagens ainda a necessidade do uso de animais esplenectomizados para sua produção, o que traz implicações éticas e a necessidade de acompanhamento veterinário pós-vacinal.

Várias alternativas para o desenvolvimento de uma nova vacina contra os agentes da TPB vêm sendo testadas há muito tempo. Entretanto, ainda não foi possível chegar a uma formulação comercial que venha substituir a forma tradicional de obtenção de imunidade contra TPB.

Vale mencionar que, para anaplasmose, além da imunidade conferida por *A. centrale* viva, uma fração de proteínas de membrana externa tem sido a preparação mais atraente

(Noh et al., 2008), capaz de proteger bovinos tanto contra alta infecção por *A. marginale* como pela prevenção de anemia severa. No caso das babesioses, microrganismos mortos inteiros também podem conferir proteção, demonstrando que o desejável desenvolvimento de vacinas não-vivas seria possível. No entanto, a obtenção de formulações de menor custo e maior reprodutibilidade lote-a-lote, sem perda de segurança e eficácia, estimulam pesquisas para o desenvolvimento de vacinas de nova geração. Entre elas o uso de um conjunto de proteínas recombinantes, muitas das quais já foram descritas no primeiro livro desta série (*Carrapatos no Brasil*, 2013).

Nos últimos anos, novas abordagens têm sido adotadas, com uso de tecnologias mais aprofundadas em genômica, proteômica, nanotecnologia e bioinformática. Assim, com análises genômicas mais completas, descrição de novos imunógenos, identificação de epítomos⁹, uso de adjuvantes e carreadores nanoparticulados, entre outras possibilidades, a pesquisa para o desenvolvimento de uma nova vacina contra TPB continua.

Dentre as proteínas principais de membrana (MSP, do inglês *Major Surface Protein*) de *A. marginale*, a MSP-1a permanece em análise, com resultados bastante promissores. A imunização de camundongos e bovinos com MSP-1a usando nanotubos de carbono como um sistema carreador de moléculas apresentou resultados bastante significativos com a indução de forte resposta imune e biocompatibilidade (Silvestre et al., 2014; Silvestre et al., 2018).

Os estudos com nanopartículas como componentes de uma formulação vacinal vêm avançando muito nos últimos anos. Além das análises com nanotubos de carbono, como já mencionado, vesículas de sílica foram avaliadas como nanocarreadores de VIRB9-1, VIRB9-2 e VIRB10 (Zhang et al., 2016; Zhao et al., 2016), imunógenos promissores identificados em *A. marginale*. Nestes sistemas nanoencapsulados, pode-se alcançar uma alta capacidade de ligação de proteínas e, seguindo-se à imunização de camundongos, é possível obter indução de resposta imune específica satisfatória. Importante dizer que linhagens de células T de bovinos, obtidas de animais imunizados com fração de proteínas da membrana externa de *A. marginale*, são também estimuladas *in vitro* por VIRB9-1, VIRB9-2 e VIRB10 quando complexadas a nanopartículas (Zhang et al., 2016).

Sequências repetitivas foram identificadas em MSP-1a como tendo efeito no processo de adesão da riquetsia a eritrócitos bovinos e células de carrapato (Herbert et al., 2017). Assim, a porção N-terminal em MSP-1a que contém estas sequências, conservadas entre isolados de *A. marginale*, também tem sido avaliada como possível componente de uma vacina.

Uma construção híbrida de proteínas, com porções repetitivas de MSP-1a e epítomos comuns de proteínas da membrana externa [(OMP, do inglês *Outer Membrane Protein*) OMP7, OMP8 e OMP9] de *A. marginale* levam à redução de riquetsemia após desafio homólogo em camundongos (Cangussu et al., 2018). Assim, a construção de quimeras proteicas apresenta potencial na elaboração de vacinas multiantigênicas.

A identificação e a utilização de epítomos conservados de células T CD4 e células B podem ser decisivos na elaboração de uma vacina contra TPB (Deringer et al., 2017). É preciso considerar a necessidade da disponibilidade de sequências genômicas de diferentes isolados de *A. marginale* e os estudos de variabilidade para diferentes proteínas (Brayton et al., 2005; Dark et al., 2011; Pierlé et al., 2014).

⁹Menor porção de antígeno com potencial de gerar a resposta imune.

O estado da arte para o desenvolvimento de uma vacina contra babesiose difere bastante em relação às pesquisas voltadas para o desenvolvimento de vacina contra *Anaplasma*. Uma discussão razoável sobre este ponto já foi apresentada no capítulo relacionado à TPB, também no primeiro livro desta série Carrapatos no Brasil, (Santos et al., 2013). Continua sendo um dos entraves ao desenvolvimento de uma vacina de subunidade o fato de que poucas proteínas de superfície são conservadas (Brayton et al., 2007; Jackson et al., 2014). A identificação de proteínas/epitopos conservados é limitada, sendo necessário também que análises de genomas de isolados de *B. bovis* e *B. bigemina* sejam feitos em maior amplitude. Associa-se a isto a realidade em relação à complexidade antigênica dos eucariotos (protozoários, neste caso) em relação aos procariotos e o intrincado ciclo de vida destes agentes patogênicos.

Resultados promissores foram obtidos para análise de uma vacina multi-antigênica composta pelas proteínas recombinantes de merozoítos de *B. bovis* MSA-2a₁, MSA-2b, MSA-2c emulsionadas em adjuvante Montanide ISA 720 (Gimenez et al., 2016). Anticorpos IgG específicos para estas proteínas, produzidos em camundongos imunizados, inibiram significativamente a invasão de eritrócitos bovinos por merozoítos de *Babesia bovis* da linhagem S2P (BboS2P). Com este resultado, a avaliação de sua eficácia em bovinos pode ser realizada.

Em estudos mais recentes com isolados de *B. bovis* obtidos no sul da África, análises dos genes de cisteína peptidase 2 (*BbCP2*), proteína de corpo esférico 4 (*BbSBP-4*) e β -tubulina (*Bb β TUB*) indicaram relação filogenética próxima entre cepas de *B. bovis* de várias partes do mundo (Mtshali; Mtshali, 2017). No entanto, análises realizadas com gene *rap-1* mostraram claramente o agrupamento filogenético de diferentes isolados do sul da África enquanto separa-se de outros agrupamentos de isolados do Brasil, Argentina, Uruguai e Estados Unidos (Mtshali; Mtshali, 2013). Assim, novos alvos de pesquisa como potenciais candidatos a componentes de uma vacina contra *B. bovis* estão sendo apresentados, mas o desenvolvimento de uma vacina de uso global apresenta-se como de maior dificuldade.

Um número ainda menor de publicações relacionadas à vacina contra *B. bigemina* tem sido disponibilizado nos últimos anos. Mas, em 2018, o gene *mic-1*, que codifica para uma proteína estocada em micronemas (do inglês *micronemal protein-1*) e associada ao processo de invasão da célula do hospedeiro, foi identificado em *B. bigemina* (Hernández-Silva et al., 2018). Em *B. bigemina* o gene *mic-1* é expresso como RNA e tem produção detectada ao nível proteico. Por fim, anticorpos anti-MIC-1 (A, B e C) foram capazes de inibir *in vitro* a infecção de eritrócitos por *B. bigemina* em diferentes níveis. A partir daí, novos estudos poderão ser realizados tendo em vista o desenvolvimento de uma vacina.

Com o intuito de desenvolver uma nova vacina viva contra *B. bovis* e *B. bigemina*, um grupo de pesquisadores no México tem contribuído em relação ao estabelecimento do cultivo *in vitro* destes dois patógenos em meio de cultura livre de soro e suplementado com insulina, transferrina, selenite e putrescina (Rojas-Martínez et al., 2017; Rojas-Martínez et al., 2018a) para a produção de cepas vacinais. Esta vacina foi recentemente testada a campo, no México, em bovinos “naïve” desafiados por infecção natural e apresentou capacidade de desenvolver proteção nestes animais (Rojas-Martínez et al., 2018b).

Embora haja considerável esforço da comunidade científica nacional e internacional no desenvolvimento de vacinas modernas contra TPB, ainda não se chegou a uma vacina comercial diferente da clássica vacina viva contendo *A. centrale* e cepas atenuadas das babesias. Diversos fatores contribuem para isso, inclusive a baixa alocação de recursos de

pesquisa para este tema, além das dificuldades técnicas na obtenção de vacinas contra microrganismos complexos e intracelulares (diversidade antigênica, pouca conservação entre isolados, sistemas de evasão bem elaborados) assim como, possíveis alterações existentes na interação parasito-hospedeiro. Ainda assim, os resultados até aqui acumulados nos estudos com *Anaplasma* e *Babesia* têm fornecido subsídios à perspectiva de desenvolvimento de novas vacinas.

Referências

- BELL-SAKYI, L.; PALOMAR, A. M.; BRADFORD, E. L.; SHKAP, V. Propagation of the Israeli vaccine strain of *Anaplasma centrale* in tick cell lines. **Veterinary Microbiology**, 30; 179 (3-4), 2015. 270-276 p.
- BOCK, R.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, Cambridge, UK, v. 129, n. S1, 2004. 247-269 p.
- BRAYTON, K. A., KAPPEMEYER, L. S., HERNDON, D. R., DARK, M. J., TIBBALS, D. L., PALMER, G. H., MCGUIRE, T.C & KNOWLES, D. P. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 102(3), 2005. 844-849 p.
- BRAYTON, K. A., LAU, A. O., HERNDON, D. R., HANNICK, L., KAPPEMEYER, L. S., BERENS, S. J., ... & FELDBLUM, T. Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. **PLoS pathogens**, 3(10), 2007. 148 P.
- BROWN, W. C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D. P.; GOFF, W. L. Immune control of *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1, 2006. 75-87 P.
- CANGUSSU, A. S.; MARIÚBA, L.A.M., LALWANI, P., PEREIRA, D.E.S., ASTOLPHI-FILHO, S., ORLANDI, P.P., EPIPHANIO, S., VIANA, K.F., RIBEIRO, M.F.B.R., SILVA, H.M.S., MARINHO, C.R.F., NOGUEIRA, P.A. A hybrid protein containing MSP1a repeats and Omp7, Omp8 and Omp9 epitopes protect immunized BALB/c mice against anaplasmosis. **Veterinary Research**, 2018. 49-56 p.
- DARK, M. J.; AL-KHEDERY, B., & BARBET, A. F. Multistrain genome analysis identifies candidate vaccine antigens of *Anaplasma marginale*. **Vaccine**, 29(31), 2011. 4923-4932 p.
- DAVEY, R. B.; COOKSEY, L. M.; DESPINS, J. L. Survival of larvae of *Boophilus annulatus*, *Boophilus microplus*, and *Boophilus hybrids* (Acari: Ixodidae) in different temperature and humidity regimes in the laboratory. **Veterinary Parasitology**, v. 40, n. 3-4, 1991. 305-313 p.
- DERINGER, J. R.; FORERO-BECERRA, E. G., UETI, M. W., TURSE, J. E., FUTSE, J. E., NOH, S. M., ... & BROWN, W. C. Identification of a T cell epitope that is globally conserved among outer membrane proteins (OMPs) OMP7, OMP8, and OMP9 of *Anaplasma marginale* strains and with OMP7 from the *A. marginale* subsp. *centrale* vaccine strain. **Clinical and Vaccine Immunology**, CVI-00406, 2017.
- ESTEVEZ, E.; POHL, P. C.; KLAFKE, G. M.; RECK, J.; FOGACA, A. C.; MARTINS, J. R.; DAFFRE, S. Low temperature affects cattle tick reproduction but does not lead to transovarial transmission of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 214, n. 3, 2015. 322-326 p.
- GIMENEZ, A. M.; FRANÇOSO, K. S., ERSCHING, J., ICIMOTO, M. Y., OLIVEIRA, V., RODRIGUEZ, A. E., ... & SOARES, I. S. A recombinant multi-antigen vaccine formulation containing *Babesia bovis* merozoite surface antigens MSA-2a 1, MSA-2b and MSA-2c elicits invasion-inhibitory antibodies and IFN- γ producing cells. **Parasites & vectors**, 9(1), 2016. 577 p.
- GOFF, W. L., BASTOS, R. G., BROWN, W. C., JOHNSON, W. C., & SCHNEIDER, D. A. The bovine spleen: interactions among splenic cell populations in the innate immunologic control of hemoparasitic infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 138(1-2), 2010. 1-14 p.
- JACKSON, A. P., OTTO, T. D., DARBY, A., RAMAPRASAD, A., XIA, D., ECHAIDE, I. E. & GUPTA, Y. The evolutionary dynamics of variant antigen genes in *Babesia* reveal a history of genomic innovation underlying host-parasite interaction. **Nucleic acids research**, 42(11), 2014. 7113-7131 p.
- HERBERT, K.; SEIDMAN D, OKI A, IZAC J, EMANI S, OLIVER LJ, MILLER D, TEGELS B, KANNAGI R, MARCONI R, CARLYON J. *Anaplasma marginale* outer membrane protein A is an adhesin that recognizes sialylated and fucosylated glycans and functionally depends on an essential binding domain. **Infection Immunology** 85:e00968–01016, 2017.
- HERNÁNDEZ-SILVA, D. J., VALDEZ-ESPINOZA, U. M., MERCADO-URIOSTEGUI, M. A., AGUILAR-TIPACAMÚ, G., RAMOS-ARAGÓN, J. A., HERNÁNDEZ-ORTIZ, R. & MOSQUEDA, J. Immunomolecular Characterization

of MIC-1, a Novel Antigen in *Babesia bigemina*, Which Contains Conserved and Immunodominant B-Cell Epitopes that Induce Neutralizing Antibodies. **Veterinary sciences**, 5(2), 2018. 32 p.

MAHONEY, D. F. Bovine babesiosis a study of factors concerned in transmission. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 63, n. 1, 1969. 1-14 p.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 5, 1972. 292-298 p.

MTSHALI, P. S.; MTSHALI, M. S. In silico and phylogenetic analyses of partial BbRAP-1, BbCP2, BbSBP-4 and Bb β TUB gene sequences of *Babesia bovis* isolates from cattle in South Africa. **BMC Veterinary Research**, 13(1), 2017. 383 p.

MTSHALI, M. S.; MTSHALI, P. S. Molecular diagnosis and phylogenetic analysis of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* hemoparasites from cattle in South Africa. **BMC Veterinary Research**, 9(1), 2013. 154 p.

NOH, S. M.; BRAYTON KA, BROWN WC, NORIMINE J, MUNSKE GR, DAVITT CM, et al. Composition of the surface proteome of *Anaplasma marginale* and its role in protective immunity induced by outer membrane immunization. **Infection Immunity** 2008;76(May (5)):2008. 2219-2226 p.

PIERLÉ, S. A.; IMAZ-ROSSHANDLER, I., KERUDIN, A. A., SAMBONO, J., LEW-TABOR, A., ROLLS, P. & BRAYTON, K. A. Genetic diversity of tick-borne rickettsial pathogens; insights gained from distant strains. **Pathogens**, 3(1), 2014. 57-72 p.

ROJAS-MARTINEZ, C.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I., MILLÁN, J. F., VIANA, K. A., RUIZ, E. G., & MARTÍNEZ, J. Á. Putrescine: Essential factor for in vitro proliferation of *Babesia bovis*. **Experimental parasitology**, 175, 2017. 79-84 p.

ROJAS-MARTÍNEZ, C.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I., MILLÁN, J. V. F., VIANA, K. Y. A., RUÍZ, E. J. G., BAUTISTA-GARFIAS, C. R. MARTÍNEZ, J. A. Á. *Babesia bigemina*: Advances in continuous *in vitro* culture using serum-free medium supplemented with insulin, transferrin, selenite, and putrescine. **Parasitology International**, 67(3), 2018a. 294-301 p.

ROJAS-MARTÍNEZ, C., RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I., MILLÁN, J. V. F., BAUTISTA-GARFIAS, C. R., CASTAÑEDA-ARRIOLA, R. O.; LIRA-AMAYA, J. J. & MARTÍNEZ, J. A. Á. Bovine babesiosis: Cattle protected in the field with a frozen vaccine containing *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* cultured *in vitro* with a serum-free medium. **Parasitology international**, 67(2), 2018b. 190-195 p.

SACCO, A. M. S. Profilaxia da Tristeza Parasitária Bovina: por quê, quando e como fazer. Embrapa Circular Técnica, 28, 2012. 12 p.

SANTOS, L. R.; ARAUJO, F.R.; RAMOS, C.A.N.; GOMES, C.C.G.; GASPAS, E.B.; BENAVIDES, M.V. Tristeza Parasitária bovina: avanços no controle. In: Andreotti, R.; Koller, W.W. (eds). **Carrapatos no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2013. 51-71 p.

SANTOS, M. E. R.; FONSECA, D. M.; BALBINO, E. M. et al. Caracterização de Perfilhos em Pastos de Capim-braquiária Diferidos e Adubados com Nitrogênio. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 38, 2009.

SANTOS, G. B.; GOMES, I. M., SILVEIRA, J. A., PIRES, L. C., AZEVEDO, S. S., ANTONELLI, A. C., ... & HORTA, M. C. Cattle Tick Fever in semi-arid of Pernambuco. Pesquisa Veterinária Brasileira, 37(1), 2017. 1-7 p.

SHORT, N. J.; FLOYD, R. B.; NORVAL, R. A. I.; SUTHERST, R. W. Survival and behaviour of unfed stages of the ticks *Rhipicephalus appendiculatus*, *Boophilus decoloratus* and *B. microplus* under field conditions in Zimbabwe. **Experimental & Applied Acarology**, v. 6, n. 3, 1989. 215-236 p.

SILVESTRE, B. T.; RABELO, E.M.L., VERSIANI, A.F., FONSECA, F.G., SILVEIRA, J.A.G., BUENO, L.L., FUJIWARA, R.T., RIBEIRO, M.F.B. Evaluation of humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized with a recombinant fragment of MSP1a from *Anaplasma marginale* using carbon nanotubes as a carrier molecule. **Vaccine** 32, 2014. 2160-2166 p.

SILVESTRE, B. T.; SILVEIRA, J.A.G., FACURY-FILHO E.J., CARVALHO, A.U., VERSIANI, A.F., ESTEVAM, L.G.T.M., ARAÚJO, M.S.S., MARTINS-FILHO, O.A., NEGRÃO-CORRÊA, D.A., RIBEIRO, M.F.B. Immune response and biochemistry of calves immunized with rMSP1a (*Anaplasma marginale*) using carbon nanotubes as carrier molecules. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, Ahead of Print, 2018.

ZHANG, B., CAVALLARO, A. S.; T. MODY, K.T., ZHANG, J., DERINGER, J.R., BROWN, W.C., MAHONY, T.J., YU, C., MITTER, N. Nanoparticle-Based Delivery of *Anaplasma marginale* Membrane Proteins; VirB9-1 and VirB10 Produced in the *Pichia pastoris* Expression System. **Nanomaterials** 6, 2016. 201 p.

ZHAO, L.; MAHONY, D., CAVALLARO, A.S., ZHANG, A.S., ZHANG, B., ZHANG, J., DERINGER, J.R., ZHAO, C., BROWN, W.C., YU, C., MITTER, N., MIDDELBERG, A.P.J. Immunogenicity of Outer Membrane Proteins VirB9-1 and VirB9-2, a Novel Nanovaccine against *Anaplasma marginale*. **PLOS ONE** April 26, 2016.

