

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Taiara Müller da Silva

**CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DA  
BABESIOSE BOVINA POR *Babesia bovis***

Santa Maria, RS  
2017

**Taiara Müller da Silva**

**CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DA  
BABESIOSE BOVINA POR *Babesia bovis***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Glaucia Denise Kommers

Santa Maria, RS  
2017

**Taiara Müller da Silva**

**CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DA  
BABESIOSE BOVINA POR *Babesia bovis***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

**Aprovado em 25 de Janeiro de 2017:**

---

**Glaucia Denise Kommers, PhD (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Maria Andréia Inkelmann, Dra. (Unijuí)**

---

**Eduardo Kenji Masuda, Dr. (Axys Análises)**

Santa Maria, RS  
2017

## DEDICATÓRIA

À minha avó, que nos alegrou por tanto tempo e nos mostrou, no fim de sua vida que a união da família é o mais importante e ainda permitiu que meu irmão se reaproximasse de nós. A vocês, minha querida vó Maria Abreu da Silva (*in memoriam*), e ao meu irmão, Diego Ribeiro Pinto, eu dedico esta dissertação.

## AGRADECIMENTOS

Não há como deixar de iniciar meus agradecimentos a Deus. A ele devo a oportunidade de viver, de estar onde estou, pelos momentos bons e dificuldades que precisei passar para crescer e aprender as coisas mais importantes da vida: caráter, humildade, generosidade, amor e respeito ao próximo.

Aos meus pais (Levi e Tânia) por terem me aceitado como filha, ainda na vida espiritual, e por terem me dado tanto amor, carinho, educação, apoio e serem meus amigos e meu principal alicerce. Amo muito vocês.

Ao meu amor Francisco, eu agradeço o carinho, apoio, compreensão, incentivo, ensinamentos e companheirismo desde que estamos juntos. E à sua família que me acolheu tão bem.

A todos os meus familiares agradeço o carinho e o apoio que sempre me deram.

À minha amiga e irmã do coração, Alessandra Bridi, meu muito obrigado por me abrigar tantas noites em sua casa, me apoiar e ouvir nas horas que mais precisei e por compartilhar ótimos momentos comigo. Às amigas, Elisiane, Caiane, Margarida, Cibele, Suelen, Alice, Anieli e Mariani que sempre me dão força pra seguir em frente.

Aos meus colegas de laboratório que sempre me auxiliaram e permitiram que este trabalho fosse possível, em especial à Stella, Walter e Tatiane. E às amizades que fiz durante estes anos de LPV: Tatiane, Monique, Ingrid, Ronaldo, Alex, Walter, Stella, Harlan, Lisanka e Glauca, meus sinceros agradecimentos pela amizade, ajuda e apoio quando precisei. E a todos aqueles que já passaram por aqui, e que à sua maneira me passaram ensinamentos, tanto técnicos quanto para a vida.

A todos os professores do LPV: Glauca Kommers, Rafael Figuera, Luiz Francisco, Claudio Barros, Marcia Cristina e Mariana Flores, que sempre transmitiram seus conhecimentos com boa vontade e estavam dispostos a tirar minhas dúvidas. E a todos aqueles professores que desde a minha infância, adolescência e, enfim vida adulta já na faculdade me ensinaram tanto e foram tão importantes para a minha formação educacional e moral. Ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade e ao CNPq pelos recursos financeiros.

A relação de orientador e orientado é praticamente uma relação de pai e filho, em que há um contato muito próximo, com dedicação muito intensa. Por isso, agradeço em especial, minha orientadora que, desde a iniciação científica, há cinco anos, fez esse papel com muita paciência, dedicação, carinho e em muitas ocasiões teve papel maternal.

Este último ano de mestrado foi um tanto quanto difícil para mim, por razões pessoais, e por isso agradeço imensamente a todos que me deram apoio, atenção e carinho. Vocês são pessoas muito importantes pra mim e nunca esquecerei o que fizeram por mim.

A todos vocês sou eternamente grata.

*“Teus pensamentos e vontades são a chave de teus atos e atitudes. São as fontes de atração e repulsão na jornada da tua vivência. Não reclame nem se faça de vítima. Antes de tudo, analisa e observa, a mudança está em tuas mãos. Reprograma tua meta, busca o bem e você viverá melhor. Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.*

*Chico Xavier*

## RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA NO DIAGNÓSTICO DA BABESIOSE BOVINA POR *Babesia bovis*

AUTORA: Taiara Müller da Silva  
ORIENTADORA: Glaucia Denise Kommers

A babesiose é uma doença hemolítica transmitida por carrapatos e causada por protozoários intraeritrocitários do gênero *Babesia*. Esta é uma doença de incidência elevada na Região Sul do Brasil e responsável por perdas econômicas consideráveis. O diagnóstico clínico-patológico pode ser feito através da demonstração do parasita pelo exame de esfregaços sanguíneos ou de tecidos frescos. Entretanto, com frequência, somente órgãos fixados em formol são remetidos para laboratórios de patologia, o que impossibilita a realização do esfregaço. O principal objetivo deste estudo foi encontrar técnicas histoquímicas alternativas e capazes de aprimorar a evidenciação de *B. bovis* intraeritrocitária. Para este estudo, foram analisadas, retrospectivamente, amostras de tecidos de 50 casos de necropsias de bovinos, as quais haviam sido fixadas em formol e processadas rotineiramente para histopatologia. Os casos foram divididos em um grupo controle, constituído por 12 casos de babesiose cerebral com substância cinzenta encefálica róseo-cereja característica (grupo A), e 38 casos sugestivos de tristeza parasitária bovina (grupo B), conforme os protocolos de necropsias. Foram testadas as técnicas histoquímicas de Azul Alciano, Azul de Metileno, Azul de Toluidina, Giemsa, Gram (método de McCallum-Goodpasture), Grocott, Ácido Periódico de Schiff e Ziehl-Neelsen. Dentre estas, observou-se que as técnicas de Azul de Metileno e Azul de Toluidina permitiram observar características morfológicas e tintoriais de maneira mais nítida, auxiliando na identificação de *B. bovis*. Adicionalmente, foram estabelecidos vários parâmetros clínico-epidemiológicos e anatomopatológicos da babesiose por *B. bovis*.

**Palavras-chave:** diagnóstico histoquímico. Azul de Metileno. Azul de Toluidina. Doenças de bovinos. Tristeza parasitária bovina. Babesiose. *Babesia bovis*.

## ABSTRACT

### HISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION IN THE DIAGNOSIS OF BOVINE BABESIOSIS BY *Babesia bovis*

AUTHOR: Taiara Müller da Silva  
ADVISOR: Glaucia Denise Kommers

Babesiosis is a hemolytic tick-borne disease caused by intraerythrocytic protozoal parasites of the genus *Babesia*. This is a disease of high incidence in the South region of Brazil and responsible for considerable economic losses. Clinical-pathological diagnosis can be made by demonstrating the parasite by examining blood smears or fresh tissues. However, frequently, only formalin-fixed organs are sent to pathology laboratories, which makes it impossible to perform the smears. The main objective of this study was to find alternative histochemical techniques capable to improve the identification of intraerythrocytic *B. bovis* in histological sections. For this study, tissue samples from 50 bovine necropsy cases were retrospectively analyzed, which had been fixed in formalin and routinely processed for histopathology. The cases were divided into a control group, consisting of 12 cases of cerebral babesiosis with characteristic pink-cherry gray matter (group A), and 38 cases suggestive of cattle tick fever (group B), according to necropsy protocols. Histochemical techniques of Alcian Blue, Methylene Blue, Toluidine Blue, Giemsa, Gram (McCallum-Goodpasture method), Grocott, Periodic Acid of Schiff and Ziehl-Neelsen were tested. Among these, it was observed that the techniques of Methylene Blue and Toluidine Blue allowed to observe morphological and dye characteristics in a clearer way, aiding in the identification of *B. bovis*. In addition, several clinical-epidemiological and anatomopathological parameters of babesiosis caused by *B. bovis* were established.

**INDEX TERMS:** histochemical diagnosis. Methylene blue. Toluidine blue. Disease of cattle. Cattle tick fever. Babesiosis. *Babesia bovis*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>11</b>
2.1	BABESIOSE .....	11
2.1.1	Definição .....	11
2.1.2	Epidemiologia.....	12
2.1.3	Sinais clínicos.....	16
2.1.4	Macroscopia .....	18
2.1.5	Histopatologia.....	19
2.1.6	Diagnóstico.....	21
2.1.7	Prevenção e tratamento .....	23
2.2	TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS.....	24
<b>3</b>	<b>ARTIGO – Caracterização histoquímica no diagnóstico da babesiose bovina por <i>Babesia bovis</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira é destaque no cenário mundial, visto que o Brasil detém o posto de maior rebanho comercial do mundo, correspondendo a aproximadamente 200 milhões de cabeças (SILVA et al., 2014). Esta espécie é muito acometida pela babesiose por *Babesia bovis*, tratando-se de uma doença de extrema importância no Brasil, com alta incidência no Rio Grande do Sul (RS) (LEAL et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006; LUCENA et al., 2010). Como o estado tem grande influência econômica no quadro da pecuária brasileira (SILVA et al., 2014), a ocorrência da doença reflete em grande impacto econômico (ALMEIDA et al., 2006). Em um levantamento de doenças de bovinos realizado no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), durante um período de 45 anos, observou-se que a tristeza parasitária bovina (TPB) foi a mais importante dentre as doenças parasitárias (LUCENA et al., 2010). Por ser uma enfermidade que gera diminuição na produção de carne e/ou leite, aborto e menor fertilidade nos animais afetados, além de altos custos com tratamentos e manejos diferenciados (COSTA et al., 2011), a TPB traduz-se em altos índices de morbidade e mortalidade, levando a prejuízos econômicos exorbitantes, com perdas anuais estimadas em mais de R\$ 3 milhões (ALMEIDA et al., 2006). Devido a isso, há um grande número de pesquisas relacionadas à epidemiologia, aspectos anatomopatológicos, diagnóstico, prevenção e tratamento da TPB.

A alta incidência de TPB na região Sul deve-se às suas características epidemiológicas, visto que esta região está caracterizada como uma área epidêmica ou de instabilidade enzoótica (KESSLER et al., 1983). Apesar de sua alta ocorrência, muitos casos não são confirmados e permanecem nos registros dos laboratórios como casos sugestivos de TPB. Isso ocorre principalmente porque grande parte dos veterinários não envia aos laboratórios amostras de sangue, considerada a técnica padrão-ouro, ou remetem os espécimes de órgãos já fixados em formol, impedindo a realização de esfregaços ou *imprints* de órgãos. A associação destes dois fatores impede que tais laboratórios confirmem o diagnóstico, pois somente com a análise histopatológica muitas vezes não se consegue identificar os micro-organismos intraeritrocitários. E assim, apenas sugere-se, baseado nos aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos, que se

trata de um caso de anemia hemolítica, porém, sem ser possível determinar sua causa (ALMEIDA et al., 2006).

Com base nisso, o objetivo principal deste estudo foi testar e aplicar de maneira alternativa as técnicas histoquímicas, comumente presentes em laboratórios de patologia veterinária, em casos sugestivos de TPB, a fim de facilitar e permitir um diagnóstico mais fidedigno de babesiose por *B. bovis* nesses laboratórios. Isso auxiliará patologistas a confirmar casos sugestivos desta doença, além de permitir determinar mais acuradamente a ocorrência desta doença na área de abrangência do LPV-UFSM.

A metodologia, os resultados, discussão e conclusão que fazem parte dessa Dissertação serão apresentadas na forma de um artigo científico (disponível no Capítulo 3) a ser submetido para publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão será dividida em duas partes. A primeira abordará os aspectos epidemiológicos, sinais clínicos, macroscopia, histopatologia, diagnóstico, prevenção e tratamento da babesiose bovina por *Babesia bovis*. Algumas características relevantes a respeito dos demais agentes do complexo tristeza parasitária bovina serão também mencionadas. A segunda parte discorrerá sobre técnicas histoquímicas auxiliares no diagnóstico de micro-organismos importantes em medicina veterinária, com ênfase em protozoários.

### 2.1 BABESIOSE

#### 2.1.1 Definição

A babesiose bovina, pertencente ao complexo de doenças denominado tristeza parasitária bovina (TPB) (BARROS et al., 2006), é causada por um parasita intraeritrocitário transmitido por carrapatos e pertencente ao filo Apicomplexa e à subordem *Piroplasmidae* (BONOLDI, 2009). Juntamente com *Theileria* spp. e *Cytauxzoon* spp. são denominados de piroplasmas (YABSLEY; SHOCK, 2013). Por isso, a babesiose também é conhecida como piroplasmose e recebe outros nomes comuns como febre do Texas, febre do carrapato e água vermelha (BARROS; FIGHERA, 2008).

Segundo a revisão de Uilenberg (2006), a babesiose trata-se de uma doença hemolítica causada por protozoários que foi identificada pela primeira vez na Romênia por Babes (1888 apud UILENBERG, 2006) e em 1893, foi comprovada sua transmissão por carrapatos (SMITH; KILBOURNE, 1893 apud UILENBERG, 2006). Mundialmente, existem descrições de aproximadamente 100 espécies de *Babesia* (SCHNITTGER et al., 2012). Entretanto, no Brasil, as únicas espécies que provocam a doença são *B. bovis* e *B. bigemina* (KESSLER et al., 1983). Juntamente com a infecção pela rickettsia *Anaplasma marginale*, formam o complexo TPB (BARROS et al., 2006). A espécie de carrapato responsável pela transmissão destes agentes no país é *Boophilus microplus* (KESSLER et al., 1983), recentemente renomeado como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURRELL; BARKER, 2003), o qual

pertencente à família Ixodidae (DE VOS; POTGIETER, 1994; YABSLEY; SHOCK, 2013).

Babesias são capazes de infectar uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, inclusive humanos, mas geralmente são espécie específicos (DE VOS; POTGIETER, 1994). Contudo, há relatos de *B. divergens* acometendo humanos saudáveis e, de forma não natural, primatas não-humanos, gerbilos e humanos esplenectomizados (YOUNG; MORZARIA, 1986). Na Região Norte do Brasil, a bubalinocultura, é muito importante para a pecuária e surtos de babesiose tem sido descritos (SILVA et al., 2014). Segundo Barros e Figuera (2008), é possível que outras espécies de ungulados também sejam infectadas, mas provavelmente não sejam importantes como reservatórios.

Todos os agentes do complexo TPB são intraeritrocitários e causam anemia hemolítica intravascular (*B. bovis* e *B. bigemina*) (DE VOS; POTGIETER, 1994) ou extravascular (*A. marginale*) (POTGIETER; STOLTSZ, 1994). Deste modo, os sinais clínicos, lesões macroscópicas e microscópicas são decorrentes do tipo de hemólise que cada micro-organismo induz. Em geral, a TPB desenvolve anemia, febre, icterícia e hemoglobinúria. Entretanto, na anaplasmose não há observação desta última manifestação, pois esta rickettsia desencadeia hemólise extravascular (POTGIETER; STOLTSZ, 1994; BARROS et al., 2006). A babesiose por *B. bovis*, além de apresentar estes sinais clínicos clássicos da TPB, também pode exibir sintomatologia nervosa, caracterizando uma doença denominada babesiose cerebral (DE VOS; POTGIETER, 1994). Esta, por sua vez, se assemelha muito à malária humana por *Plasmodium falciparum* e, em alguns casos, por *P. vivax*, já que estes protozoários (*B. bovis* e *Plasmodium* spp.) são muito semelhantes entre si. Elas desenvolvem uma doença semelhante por induzir aderência dos eritrócitos à parede dos vasos sanguíneos encefálicos (HENRIQUES, 1972; YOUNG; MORZARIA, 1986; VILORIA; SALCEDO, 2004).

### 2.1.2 Epidemiologia

Os bovinos e os carrapatos são os principais reservatórios dos agentes da TPB (BARROS; FIGHERA, 2008), desta forma, a sua ocorrência está diretamente relacionada à presença do vetor biológico (DE VOS; POTGIETER, 1994). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o único carrapato responsável pela

transmissão de *B. bovis* e *B. bigemina* no Brasil (KESSLER et al., 1983). Entretanto, *A. marginale* também pode ser transmitido por moscas, tabanídeos e por via iatrogênica, através de materiais cirúrgicos e seringas contaminadas (POTGIETER; STOLTSZ, 1994). Mundialmente, a babesiose ocorre nas Américas do Norte e do Sul, partes do sul da Europa, África, Ásia, Austrália, ilhas do Caribe e do Pacífico sul (DE VOS; POTGIETER, 1994; BARROS; FIGHERA, 2008).

Quanto aos estágios do carrapato capazes de transmitir os agentes da TPB, é válido ressaltar que nem todos disseminam as duas espécies de *Babesia* (DE VOS; POTGIETER, 1994). Os carrapatos adultos têm, como principal papel, se infectar durante o repasto e transmitir, via transovariana, para a sua prole e, usualmente, são as larvas e ninfas que disseminam estes micro-organismos (DE VOS; POTGIETER, 1994). Por serem protozoários heteroxenos, as babesias realizam a reprodução sexuada no hospedeiro intermediário (carrapato) onde se desenvolvem os esporozoítos (BONOLDI, 2009). Tais estruturas são transmitidas aos hospedeiros vertebrados (definitivos), no caso os bovinos, através da saliva durante o repasto sanguíneo, pelas formas larvais que disseminam *B. bovis*, ninfais e adultas, tanto machos quanto fêmeas, que transmitem *B. bigemina* (KESSLER et al., 1983; DE VOS; POTGIETER, 1994; BARROS et al., 2006). O período de incubação para ambos os protozoários é de aproximadamente uma a duas semanas (KESSLER et al., 1983).

A ocorrência da TPB tem grande importância em regiões tropicais e subtropicais, e está diretamente relacionada à presença e distribuição do vetor *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (DE VOS; POTGIETER, 1994; BARROS et al., 2006; FARIAS, 2007). Sabe-se que esse artrópode está presente entre os paralelos 32°N e 32°S (BARROS et al., 2006) e em altitudes abaixo de 1200 m (KESSLER; SCHENCK, 1998). Sendo assim, as taxas de morbidade e mortalidade da doença estão diretamente relacionadas à flutuação populacional do vetor (ALMEIDA et al., 2006; FARIAS, 2007, BARROS; FIGHERA, 2008), pois é a sua presença que permite o contato dos bovinos com os agentes etiológicos e, portanto, à produção de uma imunidade sólida, prevenindo a doença (COSTA et al., 2011). Apesar destes fatores (condições climáticas e comportamento do vetor), o globo terrestre foi dividido epidemiologicamente em três zonas, sendo elas: áreas livres, áreas de instabilidade enzoótica ou epidêmicas e áreas de estabilidade enzoótica ou

endêmicas (KESSLER et al., 1983; DE VOS; POTGIETER, 1994; BARROS et al., 2006).

O Brasil contém as três áreas epidemiológicas e, por estar localizado no hemisfério sul, a única região que representa uma área livre (ao sul do paralelo 32°S) é o extremo sul do Rio Grande do Sul, correspondendo aos municípios de Santa Vitória do Palmar, Jaguarão, Arroio Grande e Chuí (KESSLER; SCHENK, 1998). Nestas áreas, não há infestação dos bovinos pelos carrapatos e todos os animais são suscetíveis (KESSLER et al., 1983, ALMEIDA et al., 2006). A doença ocorre quando há a combinação da entrada acidental de animais infestados por carrapatos somado às condições climáticas favoráveis para a origem de uma segunda geração de carrapatos, a qual será a responsável por infectar os animais (ALMEIDA et al., 2006). Nestas áreas, a doença acomete animais de qualquer faixa etária e quando os animais destas áreas são transportados para locais onde há carrapatos e babesias circulantes na população bovina e carrapatos, a doença também ocorre, pois o fato dos animais não terem contato constante com os agentes da TPB os impede de desenvolver uma imunidade sólida e capaz de combater a doença (FARIAS, 2007).

Ao norte do paralelo 32°S, correspondendo à maior extensão do RS (KESSLER et al., 1983; FARIAS, 2007; ALMEIDA et al., 2006), os estados de Santa Catarina e Paraná e o sertão dos estados da Bahia, Pernambuco e Ceará (KESSLER; SCHENK, 1998; FARIAS, 2007; COSTA et al., 2011) são dominados pela área de instabilidade enzoótica ou epidêmica. Nestas áreas, há flutuação da população de carrapatos, conferindo longos períodos de ausência do vetor devido a estações de temperaturas baixas, com consequente queda nos níveis de anticorpos (BARROS; FIGHERA, 2008). Por conseguinte, quando estes animais entram novamente em contato com o vetor, ou seja, quando há condições climáticas favoráveis para a proliferação do carrapato ou quando os animais são transportados para locais onde há o carrapato (áreas endêmicas), a doença acaba ocorrendo. Nestes locais, o rebanho torna-se altamente suscetível, sendo frequentes os surtos com elevadas taxas de morbidade e mortalidade, gerando grandes prejuízos econômicos (ALMEIDA et al., 2006). Estes prejuízos também são decorrentes do uso constante de carrapaticidas e medicamentos para o tratamento de animais doentes. Os surtos ocorrem após períodos sem infestação por carrapatos, devido às condições climáticas desfavoráveis (BARROS; FIGHERA, 2008) ou por meios

artificiais, como aplicação intensiva de carrapaticidas, ou ainda pelo manejo de rotação de pastagens (FARIAS, 2007). Nestas áreas, os casos acontecem principalmente no verão (RODRIGUES et al., 2005) e outono (ALMEIDA et al., 2006) e, portanto, a ocorrência dos casos isolados ou dos surtos varia conforme a distribuição geográfica do vetor (FARIAS, 2007).

Nestas zonas, os animais mais comumente acometidos têm aproximadamente um ano de idade. Isso transcorre porque, ao nascerem, geralmente na primavera, os animais são imunizados logo nos primeiros dias de vida através do colostro e são protegidos por imunidade passiva até aproximadamente 7-11 meses. O período do inverno os impede de construir uma imunidade específica, tornando-os suscetíveis para o próximo período de infestação de carrapatos. Dessa forma, a enfermidade acomete principalmente adultos primo-infectados, com idade superior a 10 meses (FARIAS, 2007; COSTA et al., 2011), com média de 1-3 anos de idade (ALMEIDA et al., 2006). Nestas áreas, surtos também podem ocorrer quando há condições climáticas favoráveis à proliferação dos carrapatos durante os períodos frios (ALMEIDA et al., 2006; FARIAS, 2007; COSTA et al., 2011).

As áreas de estabilidade enzoótica ou endêmicas correspondem às demais partes do território brasileiro e ocupam a sua maior extensão (KESSLER et al., 1983). Nestes locais, a população de carrapatos permanece estável devido às condições climáticas sempre favoráveis, caracterizando a denominação desta zona de ocorrência da doença. Nestes locais, os animais permanecem em contato com os agentes da TPB o ano todo, propiciando a produção constante de anticorpos consideráveis e o desenvolvimento de uma sólida imunidade contra os agentes etiológicos da TPB (KESSLER et al., 1983; BARROS; FIGHERA, 2008). Quando a doença ocorre, acomete principalmente animais jovens, pois assim que os animais perdem a imunidade passiva, passam a ser desafiados e tem que iniciar o desenvolvimento da imunidade natural. Caso algum fator intrínseco ao animal prejudique essa produção, a doença pode ocorrer. O desenvolvimento da enfermidade nos animais adultos sucede a interrupção da imunidade por práticas de manejo que permitam a exposição dos bovinos à superinfestações por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, e conseqüentemente por grande inóculo de protozoários, ou que ocasionem longos períodos sem infestação, mimetizando uma área epidêmica. Nessas regiões, geralmente ocorrem casos isolados da doença (KESSLER et al., 1983; FARIAS, 2007; BARROS; FIGHERA, 2008).

Além da idade, a ocorrência da TPB também está ligada à sensibilidade do hospedeiro, à raça do animal e a fatores individuais. O RS, além de estar em uma região de alta ocorrência da doença, a maioria das criações de bovinos é composta por raças europeias, as quais são mais sensíveis ao carrapato (ALMEIDA et al., 2006; FARIAS, 2007; BARROS; FIGHERA, 2008). Além disso, a ocorrência e a intensidade da doença também dependem da espécie, virulência do agente e quantidade do inóculo (DE VOS; POTGIETER, 1994). Quanto maior for o inóculo e, conseqüentemente, a concentração de parasitas, mais grave será o quadro clínico (FARIAS, 2007). É importante enfatizar que a espécie de *Babesia* mais patogênica é *Babesia bovis* (DE VOS; POTGIETER, 1994), a qual está relacionada à maioria dos surtos de TPB nos principais laboratórios de patologia do estado (LEAL et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006). Acredita-se que a virulência de *B. bovis* esteja relacionada à sua maior capacidade de acumular eritrócitos parasitados nos capilares cerebrais da substância cinzenta, causando um quadro clínico neurológico e usualmente irreversível, conhecido como babesiose cerebral (DE VOS; POTGIETER, 1994; ANTONIASSI et al., 2009).

### **2.1.3 Sinais clínicos**

A maioria dos sinais clínicos da TPB está intimamente relacionada ao tipo de destruição eritrocitária. Desta maneira, na babesiose, as manifestações clínicas decorrentes da hemólise intravascular são: anemia, icterícia e hemoglobinúria (BARROS et al., 2006). Este tipo de hemólise é caracterizado pela presença do protozoário no interior dos eritrócitos, sofrendo divisão binária e rompendo o eritrócito na corrente sanguínea e em seguida invadindo novos eritrócitos (BONOLDI, 2009; BARROS et al., 2006). Por sua vez, na anaplasiose, os distúrbios estão relacionados à hemólise extravascular, ou seja, os eritrócitos são destruídos fora dos vasos sanguíneos, e isso ocorre principalmente no baço. Nesta forma não há hemoglobinúria, porém os demais sinais (anemia e icterícia) estão presentes (FIGHERA; GRAÇA, 2010).

Outros sinais comumente observados na TPB são febre frequentemente maior que 41 °C, palidez de mucosas, apatia, orelhas caídas, debilidade, anorexia, fraqueza, emagrecimento, pelos arrepiados, taquicardia, taquipneia, redução dos movimentos ruminais, redução ou suspensão da lactação e aborto (DE VOS;

POTGIETER, 1994; KESSLER; SCHENK, 1998; ALMEIDA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2005; FARIAS, 2007; COSTA et al., 2011). A doença pode ser aguda, subaguda ou crônica (FIGHERA; GRAÇA, 2010) e, dependendo do tempo de evolução, alguns destes sinais não irão se manifestar, como a icterícia que dificilmente ocorre em casos agudos (BARROS; FIGHERA, 2008). O curso clínico pode variar de 1-4 dias, porém, animais mais resistentes, como os bovinos jovens, podem sobreviver por períodos mais prolongados (FARIAS, 2007).

A ocorrência de sinais neurológicos na babesiose é uma característica única de infecção por *B. bovis*, doença denominada de babesiose cerebral (BARROS et al., 2006) e esta forma nem sempre está presente (FIGHERA, 2001). Os sinais clínicos são decorrentes principalmente da característica deste agente em provocar a aderência dos eritrócitos entre si e à parede dos capilares sanguíneos (estase e congestão) (KESSLER et al., 1983; DE VOS; POTGIETER, 1994; RODRIGUES et al., 2005; ANTONIASSI et al., 2009), fato este que depende muito da quantidade de inóculo e virulência do agente (DE VOS; POTGIETER, 1994). O quadro clínico apresentado na babesiose cerebral é muito semelhante à forma cerebral da malária por *Plasmodium falciparum*, em humanos (BARROS et al., 2006), e consistem principalmente de alterações neurológicas que se relacionam a problemas locomotores como andar cambaleante, incoordenação seguida de paralisia, principalmente dos membros pélvicos, tremores musculares, quedas com movimentos de pedalagem, opistótono, cegueira, pressão da cabeça contra objetos, andar em círculos, convulsões, agressividade e coma (CALLOW; MCGAVIN, 1963; DE VOS; POTGIETER, 1994; RODRIGUES et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006; FARIAS, 2007; ANTONIASSI et al., 2009). O curso clínico é, geralmente, mais rápido do que na babesiose por *B. bigemina* e dura de poucos minutos a 24-36 horas e os casos são invariavelmente fatais (BARROS et al., 2006).

Os achados hematológicos de bovinos com babesiose são tipicamente de anemia hemolítica, e incluem anemia macrocítica hipocrômica com regeneração excessiva e altos números de reticulócitos. Já nos casos agudos por *B. bovis*, observa-se anemia normocítica normocrômica. Com a destruição dos eritrócitos no interior dos vasos sanguíneos há a liberação de hemoglobina, a qual tingem o plasma com um tom acastanhado, e é vista clinicamente como hemoglobinemia (FIGHERA, 2001; FIGHERA; GRAÇA, 2010). Além disso, há diminuição do hematócrito (anemia)

que pode variar de leve a acentuada, dependendo do nível de parasitismo e imunidade do animal (BARROS; FIGHERA, 2008).

#### **2.1.4 Macroscopia**

A lesão clássica de babesiose por *B. bovis* observada no encéfalo é caracterizada pela coloração róseo-cereja do córtex telencefálico, cerebelar e os núcleos da base. Tal lesão é patognomônica de babesiose cerebral e ocorre devido à estase e congestão dos eritrócitos parasitados no lúmen dos pequenos capilares encefálicos (DE VOS; POTGIETER, 1994; RODRIGUES et al., 2005; BARROS et al., 2006; ANTONIASSI et al., 2009; FIGHERA; GRAÇA, 2010), permitindo uma fácil identificação do protozoário através de esfregaços do córtex cerebral (RODRIGUES et al., 2005), como será visto no item 2.1.5.

Da mesma forma, como os sinais clínicos, as lesões macroscópicas da TPB estão relacionadas ao tipo de hemólise. Na anemia hemolítica intravascular por *B. bovis* e *B. bigemina*, a hemoglobina contida nos eritrócitos é extravasada e acaba tingindo o plasma de vermelho (hemoglobinemia) (FIGHERA; GRAÇA, 2010). Ao ser filtrada pelos rins, a hemoglobina contida no plasma tinge este órgão, tornando-o vermelho-escuro e modificando a cor da urina eliminada, caracterizando a hemoglobinúria. A intensidade da hemoglobinúria pode variar de uma urina vermelho-escura ou enegrecida, semelhante à cor do café (BARROS et al. 2006).

A icterícia é decorrente do processo hemolítico, tanto intravascular quanto extravascular (BARROS et al., 2006; FARIAS, 2007; FIGHERA; GRAÇA, 2010), e ocorre quando há altos níveis de bilirrubina na corrente sanguínea, depositando-se nos tecidos como as mucosas visíveis e tecido subcutâneo e, em alguns casos na pele, deixando-os amarelos. Isto decorre da transformação da fração heme da hemoglobina em bilirrubina (CULLEN; BROWN, 2013).

O fígado, frequentemente apresenta-se alaranjado ou vermelho-alaranjado e aumentado de tamanho (hepatomegalia) (BARROS; FIGHERA, 2008). A alteração da coloração é devido à bilestase e é confirmada microscopicamente. A vesícula biliar também pode estar aumentada de tamanho com bile espessa (BARROS et al., 2006). Quando um fígado alaranjado ou amarelado é fixado em formol, ocorre mudança da sua cor, tornando-se verde. Isso ocorre pela oxidação por aldeído (LILLIE; PIZZOLATO, 1970).

Na anaplasmosose, na qual a hemólise é extravascular, o baço (além do fígado, pulmão e linfonodos) é o principal órgão responsável pela fagocitose e destruição dos eritrócitos parasitados, tornando-se aumentado de tamanho (esplenomegalia), (POTGIETER; STOLTSZ, 1994). Na babesiose há certo grau de hemólise extravascular que pode variar entre os indivíduos e desta maneira, desenvolver esplenomegalia (FIGHERA, 2001).

Outras lesões comumente vistas são hemorragias na forma de petéquias no epicárdio e endocárdio (RODRIGUES et al., 2005), e embebição hemoglobínica nas serosas das vísceras gastrointestinais, adquirindo uma coloração rosa-escura (RODRIGUES et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006; BARROS et al., 2006; FARIAS, 2007). A observação de sangue com aspecto aquoso é comumente vista e isso é decorrente da anemia (BARROS; FIGHERA, 2008).

### **2.1.5 Histopatologia**

As lesões microscópicas observadas geralmente só sugerem a infecção por *Babesia* sp., visto que para confirmar o diagnóstico é preciso observar os agentes no interior dos eritrócitos. Da mesma forma que os sinais clínicos e lesões macroscópicas, os achados são decorrentes da hemólise. A anemia hemolítica causa diminuição da oxigenação de tecidos como fígado e rim. No primeiro, observa-se principalmente degeneração e necrose centrolobular a paracentral. A localização da necrose é decorrente da forma como o lóbulo hepático é vascularizado. Fisiologicamente, o sangue oxigenado é transportado da artéria hepática, localizada no espaço-porta, em direção ao centro do lóbulo, logo esta última área recebe sangue menos oxigenado e, conseqüentemente, é mais suscetível à hipóxia (CULLEN; BROWN, 2013). Esta característica também é vista na infecção por *A. marginale* (FIGHERA; GRAÇA, 2010).

Outra conseqüência da hemólise é a metabolização da hemoglobina em bilirrubina. Quando há uma superprodução de bilirrubina conseqüente da hemólise, particularmente hemólise intravascular grave, superando capacidade do fígado de remover a bilirrubina do plasma e secretar a bilirrubina conjugada na bile, tal substância acaba se acumulando nos tecidos (icterícia) e é observada no fígado como trombos de bilirrubina no interior de canálculos e ductos biliares, caracterizando a bilestase (CULLEN; BROWN, 2013).

No rim, a principal lesão é a necrose do epitélio tubular renal aguda e acredita-se que existam dois mecanismos para isso: o primeiro é devido ao efeito isquêmico em decorrência da anemia grave, semelhante ao que é observado no fígado, e o segundo é pela toxicidade da hemoglobina às células epiteliais dos túbulos (BARROS; FIGHERA, 2008), e a sua presença é confirmada pela observação de cilindros eosinofílicos e granulosos no lúmen dos túbulos renais. Quando associada a esta substância, a lesão renal também é denominada de nefrose hemoglobinúrica (CULLEN; BROWN, 2013).

Outra característica muito comum em casos de TPB é a presença de células inflamatórias no interior de vasos sanguíneos teciduais (leucocitostase), entretanto, não há uma explicação para a ocorrência desta lesão. Porém, por tratar-se de uma doença infecciosa, pode-se sugerir que este fato induza uma maior circulação de células inflamatórias. Outros órgãos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea podem apresentar eritrofagocitose, a qual é decorrente da drenagem de macrófagos contendo eritrócitos no citoplasma. Tais macrófagos são os responsáveis por retirar os eritrócitos danificados da circulação (BARROS; FIGHERA, 2008).

No encéfalo, exclusivamente na babesiose por *B. bovis*, observa-se congestão dos capilares encefálicos, principalmente na substância cinzenta, mas também na substância branca (RODRIGUES et al., 2005). É esta congestão que provoca o avermelhamento do córtex encefálico, cerebelar e dos núcleos da base. Tal congestão é decorrente da citoaderência induzida por *B. bovis*, fazendo com que os eritrócitos se fixem à parede dos vasos e entre si. Ocasionalmente, no interior dos eritrócitos as estruturas protozoárias podem ser visualizadas (RODRIGUES et al., 2005; BARROS et al., 2006), porém, isso não é visto em todos os casos e depende da espessura do corte histológico, coloração adequada e da experiência do observador/patologista. Tais estruturas também podem ser vistas em outros órgãos, como rim, fígado e coração. Porém, da mesma forma, sua visualização pode ser dificultada pelos fatores citados anteriormente. Esta congestão também pode ser observada em diversos órgãos, porém no encéfalo, a estase dos eritrócitos nos capilares, principalmente da substância cinzenta, leva a diminuição da oxigenação do tecido nervoso induzindo os sinais clínicos (RODRIGUES et al., 2005; ANTONIASSI et al., 2009).

Como mencionado no início desta revisão, diversos aspectos da babesiose cerebral são semelhantes à forma nervosa da malária em humanos, entretanto

diferentemente desta, na babesiose não se observam lesões microscópicas além de congestão. Entretanto, em um trabalho de 1963, cita-se a ocorrência de dilatação dos espaços perivasculares e perineurais, edema intersticial e um caso com hemorragia perivascular (CALLOW; MCGAVIN, 1963), demonstrando que tais achados podem ser observados na babesiose por *B. bovis*.

### 2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico clínico de TPB é determinado com base na epidemiologia e sinais clínicos indicativos. A obtenção de informações como raça, idade e local de origem dos animais é muito importante, visto que a partir disso é possível determinar se os animais são suscetíveis ou não à doença. Os sinais clínicos sugestivos e a realização da necropsia e observação de lesões macroscópicas indicativas podem direcionar ainda mais o clínico ou patologista frente a um caso de TPB (KESSLER; SCHENK, 1998).

Como o objetivo dos clínicos é tentar estabelecer o diagnóstico *ante-mortem* de TPB, tanto para tratar o animal afetado, quanto para prevenir a ocorrência da doença nos demais animais do rebanho (KESSLER; SCHENK, 1998), é importante que sejam realizados exames laboratoriais. A técnica padrão-ouro é o esfregaço sanguíneo. Nos laboratórios de patologia ou patologia clínica, estes esfregaços podem ser corados com diversos corantes, porém, os mais utilizados são o panótico rápido e o giemsa citológico. Segundo a literatura, os melhores locais de coleta sanguínea, para diagnosticar babesiose por *B. bovis* e por *B. bigemina* são, respectivamente, ponta da orelha ou cauda e veia jugular, isto porque a primeira prefere vasos de menor calibre (capilares) e *B. bigemina* está mais presente na grande circulação (RODRIGUES et al., 2005; FARIAS, 2007). As amostras de sangue devem ser coletadas com anticoagulante (EDTA ou heparina) para avaliação do hemograma e confecção dos esfregaços. Entretanto, nem sempre os clínicos têm a possibilidade de executar tal técnica e acabam primeiro tratando o animal de forma mais ampla, ou seja, para ambos os agentes da TPB. Isso, muitas vezes prejudica o diagnóstico definitivo, pois determinados agentes babesídeos, principalmente o imidocarb, eliminam os protozoários do organismo dentro de 12 a 24 horas (BARROS et al., 2006).

A confirmação do diagnóstico de TPB se dá pela associação dos sinais clínicos, lesões e observação dos micro-organismos intraeritrocitários (RODRIGUES et al., 2005; BARROS; FIGHERA, 2008), visto que tão somente a observação dos micro-organismos sem os sinais típicos de anemia hemolítica indica apenas que os animais são portadores, ou seja, que tem contato com os agentes da TPB. Entretanto, não significa que os mesmos estejam doentes (BARROS et al., 2006).

Durante o atendimento clínico, a babesiose deve ser diferenciada de doenças que cursam com anemia, icterícia e hemoglobinúria (ex.: leptospirose, clostridiose [hemoglobinúria bacilar], deficiência de fósforo [hemoglobinúria pós-parto], intoxicação por cobre, intoxicação por *Brachiaria radicans*, intoxicação por *Pteridium* spp. [que causa hematúria] e intoxicação por *Senna occidentalis* [fedegoso; que causa mioglobinúria]) (KESSLER et al., 2002; FARIAS, 2007). A anaplasmosose é um importante diagnóstico diferencial, porém esta doença não desenvolve hemoglobinúria (BARROS et al., 2006). A babesiose cerebral deve ser diferenciada de outras doenças que afetam o SNC, tais como a raiva, a infecção por herpesvírus bovino (tipos 1 ou 5) e a febre catarral maligna, dentre outras (KESSLER; SCHENK, 1998; KESSLER et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006; BARROS et al., 2006; FARIAS, 2007; ANTONIASSI et al., 2009).

Quando o animal não responde ao tratamento e acaba morrendo, ou tenha de ser eutanasiado pela sua debilidade, os recursos que restam ao clínico são realizar a necropsia a campo e remeter o material fresco, congelado ou fixado em formol, ou ainda encaminhar o animal a um laboratório de patologia. Nestes casos, o diagnóstico pós-mortal é determinado através da realização de esfregaços dos órgãos frescos remetidos ou durante a necropsia. Os principais órgãos para esta técnica são baço, coração, fígado e rim. Isto porque são órgãos que contêm numerosos capilares e, portanto, há maior chance de se observar eritrócitos parasitados (CALLOW; MCGAVIN, 1963). Entretanto, nos casos em que há sinais neurológicos e o encéfalo apresente macroscopicamente a coloração róseo-cereja, característica de infecção por *B. bovis*, deve ser realizado esfregaço do córtex encefálico (DE VOS; POTGIETER, 1994). Porém, esta técnica só é capaz de ser realizada em tecidos frescos.

Caso os espécimes sejam remetidos de maneira que prejudique a avaliação macroscópica, como por exemplo, nos casos de babesiose por *B. bovis*, em que o encéfalo é encaminhado congelado ou fixado em formol, a coloração róseo-cereja

característica é mascarada e dificilmente suspeita-se da lesão. Apesar disso, quando o material é congelado ainda pode-se realizar um esfregaço do córtex encefálico e se consegue visualizar os protozoários nos capilares encefálicos. No entanto, quando o material é remetido a um laboratório de patologia já fixado em formol, tais técnicas não podem ser realizadas e a coloração de rotina, hematoxilina e eosina, nem sempre permite uma boa visualização dos agentes da TPB à microscopia de luz. Para este problema, buscou-se na literatura, técnicas capazes de evidenciar estes micro-organismos em cortes histológicos, como será apresentado no item 2.2 (Técnicas Histoquímicas) desta revisão.

Como somente babesiose e anaplasiose tem a característica de apresentar micro-organismos intraeritrocitários, devem ser diferenciadas entre si. É mais fácil diferenciá-las em esfregaços sanguíneos ou *imprints* de órgãos e a espécie dos agentes é determinada pelo método que relaciona o tamanho e o formato dos hemoparasitas com o tamanho dos eritrócitos, os quais tem aproximadamente 7 µm de diâmetro (YABSLEY; SHOCK, 2013). O tamanho permite classificar as babesias em grandes babesias, como *B. bigemina*, micro-organismo, arredondado, piriforme, com ângulo agudo e dimensões entre 2,5 e 4,5 µm; pequenas babesias, representadas por *B. bovis*, redondo ou piriforme com tamanho entre 1 e 2,5 µm; e *Anaplasma marginale*, caracterizado por ser um ponto escuro e bem corado com variação de tamanho entre 0,1 a 0,8 µm (GARDINER et al., 1998; FIGHERA, 2001; YABSLEY; SHOCK, 2013). Este último ainda deve ser diferenciado dos corpúsculos de Howell-Jolly e de precipitação de corantes (FIGHERA, 2001).

Outras formas de diagnosticar TPB são através de diagnóstico sorológico (imunofluorescência indireta, ELISA e soroaglutinação), com capacidade de determinar a situação imunológica do rebanho e, a partir disso, se estuda a melhor forma de prevenção da doença (KESSLER; SCHENK, 1998; FARIAS, 2007) e PCR do sangue e tecidos (YABSLEY; SHOCK, 2013).

### **2.1.7 Prevenção e tratamento**

O controle e a prevenção da babesiose são realizados por meio de estratégias de controle do carrapato, vacinação, premunição, quimioprofilaxia e tratamento da doença (BARROS; FIGHERA, 2008). Porém, a melhor forma de prevenção é manter os animais sempre com níveis baixos de infestação pelo carrapato, permitindo assim

que sejam inoculadas baixas quantidades dos agentes da TPB para que os indivíduos sustentem imunidade contra estes patógenos. Entretanto, isto é possível somente em áreas de estabilidade enzoótica, onde os animais estão constantemente em contato com o vetor biológico. Para animais de áreas endêmicas ou importados de áreas livres, a prevenção deve ser baseada na premunicação ou vacinação. Entretanto, ainda pode ocorrer a entrada de animais infestados com carrapatos em áreas livres e o mesmo proliferar até uma segunda geração, quando condições climáticas permitirem, e esta será responsável pela transmissão das babesias. Nestes casos, deve-se realizar o controle do carrapato e a vacinação de todo o rebanho, pois todos os animais são suscetíveis (KESSLER; SCHENK, 1998).

## 2.2 TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS

No dia-a-dia dos laboratórios de patologia humana e veterinária, utiliza-se rotineiramente a técnica de hematoxilina e eosina para demonstrar as estruturas básicas dos tecidos e para determinar a grande maioria dos diagnósticos na rotina destes estabelecimentos. A sua ampla utilização deve-se às características de afinidade dos seus corantes aos principais componentes celulares. Sendo assim, substâncias acidofílicas do citoplasma, coram-se pela eosina, enquanto que as estruturas basofílicas do núcleo coram-se pela hematoxilina (CULLING et al., 1985; PROPHET et al., 1992; MAXIE; MILLER, 2016). Apesar de esta técnica ser empregada de forma ampla em histopatologia, nem todas as estruturas contidas nos tecidos podem ser demonstradas nitidamente através dela (MAXIE; MILLER, 2016).

Em vista disso, ao longo dos anos, foram sendo desenvolvidos métodos capazes de evidenciar tais estruturas, os quais foram denominados técnicas histoquímicas ou colorações especiais (CULLING et al., 1985). Muitas destas técnicas são utilizadas para demonstrar micro-organismos e estão disponíveis comercialmente como Kits ou como reagentes que necessitam de preparação no próprio laboratório.

Informações sobre a utilização de colorações especiais para detecção de protozoários específicos em seções de tecidos são escassas. De forma geral, as técnicas histoquímicas mencionadas como utilizadas para protozoários em livros-texto incluem Giemsa, hematoxilina-férrica, PAS, PAS-hematoxilina, Gram, Ziehl-Neelsen e Grocott (GARDINER et al., 1998).

A técnica de Giemsa, além de ser amplamente utilizada como uma triagem na detecção de bactérias (PROPHET et al., 1992), também é capaz de identificar protozoários como *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp. (PROPHET et al., 1992; MCADAM; SHARPE, 2005), *Babesia* spp. (CALLOW; MGGAVIN, 1963; NEVILS et al., 2000) e *Cowdria* spp. (PROZESKY, 1987), além de rickettsias e corpúsculos de Negri (CULLING et al., 1985). Giemsa também é uma técnica alternativa ao Azul de Toluidina (AT) para demonstrar metacromaticamente os grânulos dos mastócitos (CULLING et al., 1985; PROPHET et al., 1992; MAXIE; MILLER, 2016).

O AT, por sua vez, também pode ser utilizado para detectar fungos (CULLING et al., 1985), *Anaplasma* spp. em esfregaços sanguíneos sob luz ultravioleta (POTGIETER; STOLTSZ, 1994), para avaliar a qualidade da matriz cartilaginosa em seções descalcificadas e para demonstrar matriz osteoide mineralizada em seções não descalcificadas, mucina (MAXIE; MILLER, 2016), amiloide sob luz polarizada, sedimento de líquido cefalorraquidiano e células cromafins (CULLING et al., 1985) e substância de Nissl (BEHMER et al., 1976; CULLING et al., 1985).

A técnica do Azul Alciano (AA) é utilizada para realçar alguns fungos como *Cryptococcus* (GALIZA et al., 2014) e *Sporothrix* spp. (BAZZI et al., 2016), demonstrar substâncias mucinosas (CULLING et al., 1985; PROPHET et al., 1992; MAXIE; MILLER, 2016), cartilagem (MAXIE; MILLER, 2016) e amiloide (CULLING et al., 1985).

A técnica do Ácido Periódico de Schiff (PAS) é amplamente utilizada para corar substâncias mucopolissacarídicas e membrana basal (CULLING et al., 1985), fungos (GARDINER et al., 1998; GALIZA et al., 2014; MAXIE; MILLER, 2016), algumas bactérias (PROPHET et al., 1992) e alguns protozoários (CULLING et al., 1985; GARDINER et al., 1998), tais como amebas (MCADAM; SHARPE, 2005; MAXIE; MILLER, 2016).

A impregnação pela prata de Grocott é utilizada principalmente para evidenciar fungos e oomicetos (MAXIE; MILLER, 2016). Algumas estruturas PAS-positivas, membranas basais e mucinas também podem ser evidenciadas por esse método (CULLING et al., 1985).

A coloração de Gram é utilizada para determinar se as bactérias são Gram-positivas ou Gram-negativas. A levedura *Candida albicans* tem a propriedade de ser Gram-positiva (PROPHET et al., 1992). A técnica de Gram pode ser executada em

tecidos através de vários métodos, tais como McCallum-Goodpasture (BEHMER et al., 1976), Brown-Hopps e Brown e Brenn (PROPHET et al., 1992).

A técnica de Ziehl-Neelsen é utilizada principalmente na detecção de bactérias álcool-ácido resistentes, tais como *Mycobacterium* spp. e *Nocardia* spp. (PROPHET et al., 1992; MCADAM; SHARPE, 2005). Esta técnica tem como contracoloração o Azul de Metileno, que também pode ser utilizado como coloração primária e é utilizado para bactérias em geral e substância de Nissl (BEHMER et al., 1976), para cortes semifinos de microscopia eletrônica (ARMIÉN et al., 2007), para detecção de fibras e terminações nervosas (CULLING et al., 1985) e em esfregaços sanguíneos para a pesquisa de hemoprotozoários como *Plasmodium* spp., causador da malária (PROPHET et al., 1992) e *Anaplasma* spp. utilizando luz ultravioleta (POTGIETER; STOLTSZ, 1994).

### 3 ARTIGO –

#### Caracterização histoquímica no diagnóstico da babesiose bovina por *Babesia bovis*<sup>1</sup>

Taiara Müller da Silva<sup>2</sup>, Walter V. C. Areco<sup>2</sup>, Tatiane Carginin Faccin<sup>2</sup>, Stella M. Pereira de Melo<sup>3</sup>, Rafael A. Figuera<sup>4</sup> & Glauca D. Kommers<sup>4\*</sup>

**ABSTRACT.** – Silva T. M., Areco W. V. C., Faccin T. C., Melo S. M. P., Figuera R. A. & Kommers G. D. 2016. [Histochemical characterization in the diagnosis of bovine babesiosis by *Babesia bovis*.] Caracterização histoquímica no diagnóstico da babesiose bovina por *Babesia bovis*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil. E-mail: [glaukommers@yahoo.com](mailto:glaukommers@yahoo.com)

Babesiosis is a hemolytic tick-borne disease caused by intraerythrocytic protozoal parasites of the genus *Babesia*. This is a disease of high incidence in the South region of Brazil and responsible for considerable economic losses. Clinical-pathological diagnosis can be made by demonstrating the parasite by examining blood smears or fresh tissues. However, frequently, only formalin-fixed organs are sent to pathology laboratories, which makes it impossible to perform the smears. The main objective of this study was to find alternative histochemical techniques capable to improve the identification of intraerythrocytic *B. bovis* in histological sections. For this study, tissue samples from 50 bovine necropsy cases were retrospectively analyzed, which had been fixed in formalin and routinely processed for histopathology. The cases were divided into a control group, consisting of 12 cases of cerebral babesiosis with characteristic pink-cherry gray matter (group A), and 38 cases suggestive of cattle tick fever (group B), according to necropsy protocols. Histochemical techniques of Alcian Blue, Methylene Blue, Toluidine Blue, Giemsa, Gram (McCallum-Goodpasture method), Grocott, Periodic Acid of Schiff and Ziehl-Neelsen were tested. Among these, it was observed that the techniques of Methylene Blue and Toluidine Blue allowed to observe morphological and dye characteristics in a clearer way, aiding in the identification of *B. bovis*. In addition, several clinical-epidemiological and anatomopathological parameters of babesiosis caused by *B. bovis* were established.

**INDEX TERMS:** histochemical diagnosis, Methylene Blue, Toluidine Blue, disease of cattle, cattle tick fever, babesiosis, *Babesia bovis*.

**RESUMO.** – A babesiose é uma doença hemolítica transmitida por carrapatos e causada por protozoários intraeritrocitários do gênero *Babesia*. Esta é uma doença de incidência elevada na Região Sul do Brasil e responsável por perdas econômicas consideráveis. O diagnóstico clínico-patológico pode ser feito através da demonstração do parasito pelo exame de esfregaços sanguíneos ou de tecidos frescos. Entretanto, com frequência, somente órgãos fixados em formol são remetidos para laboratórios de patologia, o que impossibilita a realização do esfregaço. O principal objetivo deste estudo foi encontrar técnicas histoquímicas alternativas e capazes de aprimorar a evidenciação de *B. bovis* intraeritrocitária. Para este estudo, foram analisadas retrospectivamente amostras de tecidos de 50 casos de necropsias de bovinos, as quais haviam sido fixadas em formol e processadas rotineiramente para histopatologia. Os casos foram divididos em um grupo controle, constituído por 12 casos de babesiose cerebral com substância cinzenta encefálica róseo-cereja característica (grupo A), e 38 casos sugestivos de tristeza parasitária bovina (grupo B), conforme os protocolos de necropsias. Foram testadas as técnicas histoquímicas de Azul Alciano, Azul de Metileno, Azul de Toluidina, Giemsa, Gram (método de McCallum-Goodpasture), Grocott, Ácido Periódico de Schiff e Ziehl-Neelsen. Dentre estas, observou-se que as técnicas de Azul de Metileno e

<sup>1</sup> Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, Centro de Ciência Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

<sup>3</sup> Curso de Medicina Veterinária, CCR, UFSM, Santa Maria, RS.

<sup>4</sup> Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM.

\*Autor para correspondência: [glaukommers@yahoo.com](mailto:glaukommers@yahoo.com)

Azul de Toluidina permitiram observar características morfológicas e tintoriais de maneira mais nítida, auxiliando na identificação de *B. bovis*. Adicionalmente, foram estabelecidos vários parâmetros clínico-epidemiológicos e anatomopatológicos da babesiose por *B. bovis*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: diagnóstico histoquímico, Azul de Metileno, Azul de Toluidina, doenças de bovinos, tristeza parasitária bovina, babesiose, *Babesia bovis*.

### INTRODUÇÃO

Babesiose é uma doença hemolítica transmitida por carrapatos (*Rhipicephalus [Boophilus] microplus*) e causada por protozoários intraeritrocitários do gênero *Babesia* (De Vos & Potgieter 1994, Barros et al. 2006, Farias 2007, Figuera & Graça 2010). Este parasita causa a doença babesiose, que pertence ao complexo denominado tristeza parasitária bovina (TPB), no qual ainda está envolvido o agente etiológico *Anaplasma* spp.. A TPB tem grande importância econômica no Brasil devido às perdas com mortes, prevenção e tratamento dos animais (Patarroyo et al. 1982, Kessler et al. 1983, De Vos & Potgieter 1994, Almeida et al. 2006, Uilenberg 2006). No Brasil, há somente duas espécies responsáveis pela babesiose em bovinos, sendo elas *B. bovis* e *B. bigemina*. A primeira, uma babesia pequena, é a mais patogênica e responsável pelo desenvolvimento de sinais nervosos nos bovinos, denominada babesiose cerebral. Ambas as babesias desenvolvem uma doença hemolítica caracterizada principalmente por anemia, febre, icterícia e hemoglobinúria, entretanto, a babesiose por *B. bigemina* causa uma doença mais branda (Kessler et al. 1983, De Vos & Potgieter 1994, Barros et al. 2006, Figuera & Graça 2010).

Como os sinais clínicos de babesiose são muito semelhantes entre as duas espécies, quando não há sinais neurológicos, é muito comum que ambas sejam confundidas clinicamente (De Vos & Potgieter 1994) e até mesmo com outras doenças (Costa et al. 2011), incluindo anaplasmoses, na qual não se observa hemoglobinúria (Barros et al. 2006). Nas infecções por *B. bovis*, podem ocorrer sinais neurológicos o que pode constituir-se em um fator determinante para concluir o diagnóstico clínico (OIE 2010). Os sinais neurológicos são inespecíficos e, portanto, devem ser diferenciados de outras doenças que acometem o sistema nervoso central (SNC) de bovinos (Barros et al. 2006). Os sinais neurológicos, na babesiose cerebral, são resultado do sequestro de eritrócitos nos capilares do cérebro, conferindo a cor característica róseo-cereja, pois *B. bovis* induz a aderência dos eritrócitos uns aos outros e à parede vascular de capilares sanguíneos (Callow & McGavin 1963, Rodrigues et al. 2005, Antoniassi et al. 2009, Figuera & Graça 2010).

O diagnóstico clínico de babesiose pode ser feito a partir dos sinais clínicos aliados aos achados laboratoriais (observação de parasitas intraeritrocitários em esfregaços sanguíneos) (Callow & McGavin 1963, Patarroyo et al. 1982, Sanches et al. 2000, Figuera 2001, Rodrigues et al. 2005, Almeida et al. 2006, Costa et al. 2011). Já a demonstração do parasita em animais mortos pode ser feita pelo exame de esfregaços de sangue periférico (quando a morte for recente) e tecidos como encéfalo, rins, coração, baço e fígado (Callow & McGavin 1963). Os esfregaços podem ser corados com Giemsa (Callow & McGavin 1963, Patarroyo et al. 1982, Kessler et al. 1983, OIE 2010) ou panótico rápido (Rodrigues et al. 2005, Figuera & Graça 2010). Entretanto, tal técnica só pode ser realizada em tecidos frescos. Porém, com frequência, os órgãos remetidos aos laboratórios de patologia estão fixados em formol.

Através do exame histopatológico há uma alta frequência de diagnósticos sugestivos de babesiose/TPB devido à dificuldade de se observar os organismos intraeritrocitários por meio da coloração de rotina (hematoxilina e eosina) e também pela escassez de informações sobre colorações especiais que os evidenciem. Além disso, a utilização da técnica de imuno-histoquímica, que possibilitaria a identificação de antígenos espécie-específicos, não está disponível pela ausência de anticorpos comerciais, e a utilização da reação em cadeia de polimerase (PCR) poderia ser limitada, considerando-se que a positividade para um determinado agente do complexo TPB não significa que os animais estejam doentes, pois poderiam ser apenas portadores destes micro-organismos (Barros et al. 2006, Néó et al. 2016).

Sendo assim, o principal objetivo deste estudo foi encontrar técnicas histoquímicas alternativas e capazes de aprimorar a evidência de *B. bovis* intraeritrocitária em tecidos fixados e processados rotineiramente para histopatologia. Adicionalmente foram revisados os aspectos clínico-epidemiológicos e anatomopatológicos dos casos positivos para este agente.

### MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo, foram revisados os protocolos de necropsias dos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), dos quais foram selecionados 12 casos de babesiose cerebral (grupo A) e 38 casos sugestivos de TPB (grupo B), totalizando 50 bovinos.

As necropsias foram realizadas pela equipe do LPV-UFSM ou por veterinários de campo. Foram coletadas dos protocolos informações tais como sexo, raça, idade, sinais clínicos, realização e tipo de tratamento, época do ano, lesões macroscópicas e microscópicas. Os 12 casos de babesiose cerebral foram selecionados pela alteração encefálica característica da doença, isto é, a coloração róseo-cereja da substância cinzenta e foram utilizados como controles positivos para esta infecção. Para os demais 38 casos deste estudo, os critérios de inclusão foram o histórico clínico e/ou lesões macroscópicas e/ou microscópicas descritas nos protocolos e sugestivas de babesiose/TPB, porém sem a coloração róseo-cereja encefálica.

Os espécimes haviam sido fixados em formol a 10% e processados rotineiramente para histopatologia. Os fragmentos de encéfalo, rim, fígado e baço foram selecionados para análise conforme indicação da literatura (Patarroyo et al. 1982, De Vos & Potgieter 1994). Numa primeira etapa, os encéfalos incluídos em parafina, provenientes dos 12 casos de babesiose cerebral, foram cortados em seções de 3µm e corados pela hematoxilina e eosina (HE; para avaliação da presença de organismos intraeritrocitários) e pelas técnicas histoquímicas de Azul Alciano (AA), Azul de Metileno (AM), Azul de Toluidina (AT), Giemsa, Gram (método de McCallum-Goodpasture), Grocott, Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Ziehl-Neelsen (ZN), na busca de protozoários intraeritrocitários. As técnicas de Giemsa, Grocott, PAS e ZN foram realizadas com base nos seus respectivos kits comerciais (EasyPath®). Enquanto que as demais técnicas (AA e Gram) foram realizadas conforme Behmer et al. (1976) e Culling et al. (1985). As colorações AM e AT foram adaptadas de Behmer et al. (1976) e constituíram-se de desparafinização, desidratação, exposição ao corante por dois minutos e lavagem em água corrente por um minuto para AM e água destilada para AT, seguido de desidratação, clarificação e montagem.

Após todas estas colorações especiais serem realizadas nos casos do grupo A, avaliaram-se as lâminas, e apenas as técnicas que evidenciaram os protozoários intraeritrocitários de maneira satisfatória, foram selecionadas e aplicadas nos demais órgãos do grupo A e nos 38 casos suspeitos de babesiose/TPB do grupo B, com a finalidade de detectar casos com infecção por *B. bovis*. A morfologia de *B. bovis*, observada nos casos do grupo A, incluiu os critérios descritos na literatura: estruturas pequenas, redondas ou piriformes, com dimensões entre 1,5 e 2,4 µm (Gardiner et al. 1998). Foram considerados como diagnósticos diferenciais as infecções por *B. bigemina* (organismo grande com 2,5 a 4,5 µm, arredondado, piriforme arranjado em ângulo agudo) e por *A. marginale* (um ponto escuro, bem corado medindo 0,1 a 0,8 µm). Ao finalizar esta etapa no grupo B, somente foram avaliados os aspectos clínico-epidemiológicos e anatomopatológicos dos casos positivos para *B. bovis*.

As seções histológicas foram analisadas pelas técnicas histoquímicas em duas magnificações (400x [todos os casos] e 1000x [sob imersão; casos selecionados]). A visualização dos micro-organismos foi classificada em positiva (+; quando os protozoários foram facilmente observados), fraca (+/-; quando foram observados protozoários, porém com pouca nitidez) ou negativa (-; quando não foram observados protozoários intraeritrocitários). As imagens dos parasitas intraeritrocitários foram obtidas através de um microscópio Olympus BX51, com câmera digital DP21, controlada pelo programa Olympus CellSens®.

## RESULTADOS

### Grupo A

#### Alterações clínico-epidemiológicas

No grupo A (babesiose cerebral), os 12 bovinos morreram espontaneamente. Dentre eles, nove eram fêmeas e três eram machos. A idade variou de três semanas a sete anos, sendo que os mais acometidos tinham entre um e três anos. Quanto à raça, três eram sem raça definida (SRD) e os 75% restantes eram de raças de origem europeia. Os casos ocorreram principalmente no verão e outono. O tratamento específico para TPB foi realizado em cinco casos. Dentre os fármacos mais utilizados estavam o diacetato de diminazeno, dipropionato de imidocarb e oxitetraciclina.

Os sinais clínicos neurológicos mais comumente descritos foram tremores, incoordenação, andar cambaleante, agressividade, paralisia dos membros pélvicos, desvio lateral do pescoço e andar em círculo, decúbito lateral, pressão da cabeça contra objetos e movimentos constantes da cabeça. Outros sinais clínicos observados foram apatia, anorexia, febre, sialorreia, diarreia escura com estrias de sangue, debilidade, taquicardia, taquipneia e diminuição dos movimentos ruminatórios, afastamento do rebanho e prostração, fraqueza e anemia.

#### Lesões macroscópicas

Nos 12 casos desse grupo, a lesão macroscópica encefálica (critério de inclusão) foi a coloração róseo-cereja da substância cinzenta (Fig.1 e 2). O rim foi remetido em sete casos e em quatro deles estava vermelho-escuro (Fig.3). O fígado foi remetido em nove casos e estava alaranjado, castanho-amarelado ou

escuro e com hepatomegalia (Fig.4 e 5). O baço foi enviado em oito casos, nos quais havia congestão, esplenomegalia e protrusão da polpa vermelha sobre a cápsula (Fig.6).

### **Lesões microscópicas**

No encéfalo, havia congestão dos capilares sanguíneos da substância cinzenta em todos os casos (Fig.7). A presença de *B. bovis* foi relatada em alguns deles através do esfregaço do tecido encefálico quando remetido não fixado. No rim, foi observado material hialino (proteínáceo) nos espaços urinários, necrose tubular com regeneração ou associada a cilindros de hemoglobina (Fig.8), congestão de vasos sanguíneos e focos de hemorragia na região medular. No fígado havia pigmento amarelo-ouro (bilestase) no interior de canálculos e/ou ductos biliares (Fig.9), necrose centrolobular (Fig.10) e periportal, necrose aleatória de hepatócitos, leucocitostase, deposição de pigmento granular marrom-dourado (hemossiderina) no interior das células de Kupffer, infiltrado inflamatório mononuclear associado à necrose aleatória de hepatócitos, congestão do parênquima hepático, hematopoiese extramedular e eritrofagia. No baço, foram observadas congestão acentuada do parênquima esplênico, hematopoiese extramedular, eritrofagia e macrófagos contendo hemossiderina.

### **Aspectos histoquímicos**

No Quadro 1 estão demonstrados os resultados das técnicas histoquímicas de HE, AM e AT. Em todos os casos do grupo A foram observados organismos intraeritrocitários no encéfalo através da coloração de rotina de HE, porém com nitidez limitada. No rim, os micro-organismos foram observados em seis casos, no fígado em seis casos e no baço em cinco casos.

Dentre as colorações testadas neste estudo, a que resultou em melhor evidência dos protozoários foi o AM, pois corou os eritrócitos em azul-esverdeado mais claro e os organismos em azul-escuro, permitindo uma boa visualização e nitidez de sua morfologia. Este corante também faz parte da contracoloração da técnica de ZN, e desta forma os protozoários também puderam ser visualizados pelo ZN, porém não mostraram álcool-ácido resistência. A segunda técnica que se mostrou efetiva para a demonstração de *B. bovis* foi o AT, corando os eritrócitos em amarelo-esverdeado e os protozoários em azul-escuro. A coloração de Giemsa corou os parasitas em roxo-escuro, enquanto que as hemácias adquiriram um tom rosa-claro, permitindo sua visualização, porém com menor nitidez que o AM e o AT. O PAS evidenciou os protozoários por meio da sua contracoloração, hematoxilina de Carazzi, mas os organismos não foram PAS-positivos. As técnicas de Gram, AA e Grocott foram negativas.

No encéfalo, *B. bovis* foi observada principalmente em capilares da substância cinzenta (Fig.11-13). Porém, em algumas seções foi possível observar também em capilares da substância branca e em alguns vasos de maior calibre, onde os eritrócitos parasitados estavam aderidos à parede do vaso. No rim, os protozoários eram facilmente observados em capilares do interstício renal e dos glomérulos (Fig.14-16). No fígado, a visualização destes micro-organismos era mais clara em vasos dos espaços porta, entretanto, quando havia uma alta parasitemia, também era possível observá-los em sinusoides e veias centrolobulares. Observou-se que nos materiais remetidos já fixados em formol, a visualização de *B. bovis* no baço foi prejudicada pela grande quantidade de pigmento de formol, entretanto, nestas ocasiões, a observação de protozoários em capilares da cápsula esplênica auxiliou o diagnóstico. Nos casos em que havia grande quantidade de micro-organismos, os organismos intraeritrocitários eram facilmente visualizados na polpa vermelha.

## **Grupo B**

### **Aspectos histoquímicos**

Através do tamanho e características morfológicas dos micro-organismos, foi possível determinar a etiologia em 29 dos 38 bovinos suspeitos, perfazendo 76,32% (29/38). Identificou-se *B. bovis* em 21 casos (21/29), *B. bigemina* em quatro casos (4/29) e *A. marginale* em quatro bovinos (4/29). No Quadro 2 estão detalhados os achados histoquímicos das técnicas de HE, AM e AT aplicadas no grupo B. Semelhantemente ao observado no grupo A, na grande maioria dos casos houve melhor evidência dos protozoários por meio das colorações de AM e AT comparado à técnica de HE.

Os aspectos clínico-epidemiológicos e anatomopatológicos dos oito casos positivos para os demais agentes da TPB e dos nove casos negativos foram desconsiderados neste estudo, sendo que nestes não foi possível identificar qualquer agente ou causa para os sinais clínicos e suspeita do patologista. Os principais achados nos casos positivos de babesiose a *B. bovis* estão resumidos a seguir.

### **Alterações clínico-epidemiológicas e anatomopatológicas**

Dos 21 bovinos positivos para *B. bovis*, 20 morreram espontaneamente e em um caso esta informação estava ausente. As fêmeas foram acometidas em 14 casos, machos em 6 e em um caso não havia

informação do sexo. A idade dos animais variou de 15 dias a nove anos, porém a maioria dos animais tinha entre um e quatro anos. Com relação às raças, 24 casos eram de origem europeia, sete casos não tinham raça definida e em sete não havia tal informação. Quanto à época de ocorrência, 14 ocorreram no outono, 13 no verão, nove no inverno e dois na primavera. Dentre os 21 bovinos positivos, em 11 havia sido realizado tratamento para TPB, entretanto em apenas seis foi informado o medicamento utilizado. Os fármacos mais utilizados foram diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb e oxitetraciclina.

Os sinais clínicos mais frequentes foram decúbito, febre, icterícia, anorexia, anemia, diarreia e apatia. Alguns bovinos apresentaram sinais neurológicos que consistiam de agressividade, andar cambaleante, dificuldade de locomoção e tremores musculares. Outros achados menos frequentes foram secreção mucopurulenta na conjuntiva e edema palpebral, prostração, sialorreia e diminuição dos movimentos ruminais, hemoglobinúria, taquicardia, emagrecimento e orelhas caídas, afastamento do rebanho e dificuldade respiratória.

O encéfalo foi enviado em quatro casos, nos quais não foram observadas alterações macroscópicas. O rim foi enviado em 15 casos, dos quais 10 apresentaram-se vermelho-escuros. O fígado somente não foi remetido em um caso e nos demais, o órgão estava alaranjado, amarelado ou esverdeado (após a fixação). Foi ainda informado que o fígado estava aumentado de tamanho em cinco casos. O baço foi enviado em 15 casos, nos quais as alterações mais observadas foram esplenomegalia, protrusão da polpa vermelha sobre a cápsula e parênquima de aspecto carnoso.

No encéfalo havia congestão leve dos capilares do córtex encefálico em dois casos. Nos rins observou-se necrose tubular, cilindros de hemoglobina, cilindros hialinos, regeneração tubular e congestão difusa. No fígado, a lesão mais observada foi a bilestase canalicular e ductal, necrose centrolobular a paracentral, degeneração gordurosa, eritropoiese extramedular, eritrofagia e leucocitostase sinusoidal. Lesões menos frequentes foram congestão do parênquima, necrose individual de hepatócitos e raros agregados de neutrófilos nos espaços-porta. Congestão esplênica foi a lesão mais frequentemente observada, seguida de macrófagos com hemossiderina, eritrofagocitose e eritropoiese extramedular na polpa vermelha.

## DISCUSSÃO

Parte deste estudo diz respeito à caracterização dos aspectos clínico-epidemiológicos e anatomopatológicos da babesiose bovina por *B. bovis*. Observou-se que, apesar de não haver predisposição por sexo (Barros et al. 2006), houve predomínio de fêmeas em ambos os grupos. Os animais com idade entre um e três anos foram os mais acometidos no grupo A, e entre um e quatro anos no grupo B, semelhantemente ao que é descrito na literatura (Rodrigues et al. 2005, Almeida et al. 2006). Este fato se deve a primo-infecção dos animais com mais de 10 meses, visto que os bezerros são protegidos por imunidade não específica até aproximadamente 7-11 meses de idade (Farias 2007, Costa et al. 2011). Conforme a literatura, as raças de origem europeia são mais sensíveis à infestação pelo carrapato (Almeida et al. 2006, Farias 2007), e como observado neste estudo, mais suscetíveis à infecção por *Babesia* spp. (De Vos & Potgieter 1994, Barros et al. 2006).

Os sinais clínicos observados nos bovinos do grupo A (com lesão encefálica macroscópica patognomônica), foram considerados como os mais característicos desta doença na sua forma neurológica, conforme descrito na literatura (Callow & McGavin 1963, De Vos & Potgieter 1994, Rodrigues et al. 2005). Como estes sinais neurológicos são inespecíficos, a babesiose cerebral deve ser diferenciada de outras doenças que acometem o SNC de bovinos (Rodrigues et al. 2005, Almeida et al. 2006, Barros et al. 2006, Farias 2007, Antoniassi et al. 2009). Outros sinais comumente observados estão relacionados com o fato de a babesiose ser um distúrbio hemolítico intravascular e acarretar sinais clínicos e lesões macroscópicas caracterizadas por anemia, hemoglobinúria e icterícia (Figuera 2001, Barros et al. 2006, Figuera & Graça 2010).

Lesões macroscópicas relacionadas à anemia hemolítica como esplenomegalia, hepatomegalia, fígado alaranjado, rins vermelho-escuros e urina vermelho-escura são alterações muito frequentes nesta doença (Barros et al. 2006, Antoniassi et al. 2009, Figuera & Graça 2010) e sempre devem remeter à um quadro de babesiose, como foi observado em ambos os grupos deste estudo. A coloração róseo-cereja da substância cinzenta do encéfalo é patognomônica de babesiose cerebral, a qual é causada por *B. bovis* (De Vos & Potgieter 1994, Rodrigues et al. 2005, Barros et al. 2006, Antoniassi et al. 2009, Figuera & Graça 2010). Esta característica foi utilizada neste estudo, como critério de inclusão para os casos do grupo A, por conferir maior confiabilidade às observações histológicas e histoquímicas referentes ao agente *B. bovis*. Esta alteração ocorre devido à estase dos eritrócitos parasitados nos pequenos capilares encefálicos (Antoniassi et al. 2009, Figuera & Graça 2010), permitindo identificar os organismos principalmente através de esfregaços do córtex cerebral, mas também em cortes histológicos (Kessler et al. 1983, Rodrigues et al. 2005, Barros et al. 2006, Figuera & Graça 2010), como observado neste estudo. Porém, em

alguns casos do grupo B, em que o encéfalo foi remetido, foram observadas babesias através das colorações histoquímicas, apesar da lesão macroscópica não estar presente. Isto pode ser explicado pelo fato de alguns materiais terem sido remetidos já fixados em formol, ou enviados congelados (o que mascara a lesão macroscópica) ou ainda porque a congestão dos capilares era leve, sendo insuficiente para desenvolver a lesão macroscópica característica.

A localização do protozoário nos capilares dos órgãos internos é uma característica biológica da espécie *B. bovis* (Callow & McGavin 1963, Young & Morzaria 1986) e os achados histoquímicos deste estudo, corroboram com esta informação, pois o agente era observado principalmente no encéfalo, rim e fígado, em ordem decrescente de frequência. Esta espécie de protozoário induz o acúmulo de eritrócitos parasitados nesses pequenos vasos, causando estase e obstrução dos mesmos através da ativação dos sistemas das cininas, da coagulação e do complemento. Acredita-se que as alterações degenerativas de anóxia façam parte da patogênese no desenvolvimento dos sinais neurológicos da babesiose cerebral (Kessler et al. 1983, Figuera 2001, Rodrigues et al. 2005, Uilenberg 2006). Lesões microscópicas relacionadas a distúrbios hemolíticos (bilestase, acúmulos de hemossiderina, necrose e regeneração de túbulos, formação de cilindros de hemoglobina e necrose hepática centrolobular), como vistas nos bovinos deste estudo, sempre devem levantar a suspeita de babesiose (Rodrigues et al. 2005, Barros et al. 2006, Farias 2007, Figuera & Graça 2010).

Informações referentes ao tratamento para babesiose são muito importantes no que se refere ao estabelecimento do diagnóstico, pois os medicamentos específicos destroem os protozoários intraeritrocitários em torno de 24 horas após a instituição do mesmo, diminuindo substancialmente a possibilidade de encontrar os agentes durante o diagnóstico citológico e histopatológico (Barros et al. 2006). Apesar disso, observou-se que em ambos os grupos deste estudo, mesmo nos casos em que havia histórico de tratamento prévio, foi possível visualizar os parasitas através das colorações histoquímicas. Para explicar este fato, sugere-se que o tempo de instituição da medicação específica pode ter sido inferior às 24 horas, que a dose foi inferior à recomendada ou ainda que o inóculo de babesias fosse muito grande para que o medicamento pudesse destruí-las.

As maiores dificuldades para confirmar o diagnóstico histopatológico de babesiose, estão relacionadas ao envio inadequado de material, como amostras congeladas, autolisadas, realização de tratamento prévio, mas, principalmente, material já fixado em formol, pois isto mascara a coloração róseo-cereja do encéfalo e dificulta a suspeita de babesiose, impedindo a realização de esfregaços de órgãos, sobretudo do encéfalo. Adicionalmente, a visualização do agente através da coloração de rotina (HE) é limitada. Apesar de esta técnica ser empregada de forma ampla em histopatologia, nem todas as estruturas contidas nos tecidos podem ser demonstradas nitidamente através dela (Maxie & Miller 2016).

Na literatura, algumas colorações já foram utilizadas para demonstrar protozoários em esfregaços sanguíneos, tais como Giemsa (Gardiner et al. 1998), panótico rápido (Rodrigues et al. 2005), azul de metileno para malária (Brasil, 2005) e para rickettsias como *Anaplasma* spp. (Potgieter & Stoltz 1994). Entretanto, informações sobre a utilização de colorações especiais para detecção de protozoários em seções de tecidos são escassas, particularmente no que se refere à *B. bovis*. Para este agente e para *Cowdria ruminantium* já foi descrita a utilização do Giemsa em cortes histológicos (Callow & McGavin 1963, Prozesky 1987, Nevils et al. 2000). Entretanto, algumas outras técnicas histoquímicas são mencionadas genericamente para detecção de protozoários incluindo hematoxilina-férrica, PAS, Gram, Ziehl-Neelsen e Grocott (Gardiner et al. 1998).

Baseado nisso, foram testadas colorações especiais comumente presentes em laboratórios de patologia, numa tentativa de encontrar técnicas capazes de melhor evidenciar *B. bovis*. As colorações de AM, AT e Giemsa revelaram a presença dos agentes intraeritrocitários. Entretanto, dentre estas técnicas, elegeram-se as colorações de AM e AT para serem empregadas no grupo B, por serem as técnicas mais práticas (menor tempo de execução), por demonstrarem maior nitidez para evidenciação da morfologia de *B. bovis*, quando comparado com o HE e com o Giemsa, e porque esta última coloração já havia sido descrita anteriormente (Callow & McGavin 1963, Nevils et al. 2000). A coloração de ZN não apresentou a sua característica de álcool-ácido resistência para *B. bovis*, porém o organismo foi visualizado por ter sido corado pelo AM, que é o corante da contracoloração desta técnica (Behmer et al. 1976, Prophet et al. 1992). De forma semelhante, quando a técnica do PAS foi empregada, *B. bovis* foi evidenciada somente pela contracoloração com hematoxilina de Carazzi. As técnicas AA, Grocott e Gram não detectaram *B. bovis*.

Várias reações podem ocorrer entre os corantes e os elementos-alvo nos tecidos. Dentre eles podem ser consideradas as ligações eletrostáticas, de hidrogênio, covalentes e hidrofóbicas, forças de Van der Waal, agregações de corantes e permeabilidade tecidual. Todavia, o mecanismo de afinidade entre o corante e seu alvo é conhecido em relativamente poucas colorações histoquímicas. Isso pode ser considerado como de menor importância quando a coloração é empregada especificamente para melhorar

a evidenciação das características morfológicas de um agente, como nesse estudo (Culling et al. 1985). Dessa forma, as interações específicas entre os corantes de AM e AT e os micro-organismos aqui estudados não puderam ser determinadas.

Tais técnicas facilitaram a visualização e determinação da espécie dos agentes da TPB, dando ênfase para *B. bovis*, pois evidenciaram os organismos por meio de seu contraste com o eritrócito. A técnica do AM apresentou maior nitidez na detecção e identificação da morfologia de *B. bovis* em relação ao AT, corando os eritrócitos de azul-claro esverdeado, enquanto que os agentes coraram-se de azul-escuro e tinham seus limites bem definidos. Ambas as técnicas permitiram comparar o tamanho do agente com o tamanho do eritrócito o que facilitou a determinação de sua espécie. Observou-se que *B. bovis* foi o agente com maior número de organismos nas lesões, e diferenciou-se de *B. bigemina* por esta ser bem maior e ocupar aproximadamente a metade do tamanho de um eritrócito. Enquanto que *A. marginale* era dificilmente observado, sendo possível somente com o uso da imersão (1000x). Quanto à localização dos organismos observou-se que *B. bovis*, pela sua característica biológica já descrita (Callow & McGavin 1963, Young & Morzaria 1986), localizou-se principalmente em capilares do encéfalo, como visto no grupo A, seguido do rim, fígado e baço. Já *B. bigemina* é um agente que foi observado em menor número, porém em vasos de diferentes calibres. Quanto a *A. marginale*, este era de difícil visualização sem o auxílio de imersão e o órgão onde melhor se observou este agente foi o baço. Esta observação está possivelmente relacionada à sua característica de desenvolver hemólise extravascular.

O AM não é frequentemente utilizado como uma coloração primária na rotina histoquímica da maioria dos laboratórios. Esta técnica é utilizada em esfregaços sanguíneos para a pesquisa de *Plasmodium* spp., causador da malária (Prophet et al. 1992), e *Anaplasma* spp. utilizando luz ultravioleta (Potgieter & Stoltz 1994). Ela também já foi descrita para detectar bactérias em geral e substância de Nissl (Behmer et al. 1976), e para detecção de fibras e terminações nervosas (Culling et al. 1985).

O corante AT é utilizado rotineiramente para corar metacromaticamente (de um vermelho-arroxeadado) os grânulos dos mastócitos (Prophet et al. 1992, Behmer et al. 1976). Entretanto, para os agentes aqui estudados, o uso do corante AT revelou um efeito ortocromático (onde os elementos-alvo coram-se em azul) (Culling et al. 1985). Além disso, o AT também é descrito como utilizado para detectar fungos (Culling et al. 1985), para avaliar a qualidade da matriz cartilaginosa em seções descalcificadas e para demonstrar matriz osteoide mineralizada em seções não descalcificadas, mucina (Maxie & Miller 2016), amiloide sob luz polarizada, sedimento de líquido cefalorraquidiano, células cromafins (Behmer et al. 1976) e substância de Nissl (Culling et al. 1985, Behmer et al. 1976). O AT já foi utilizado em esfregaços sanguíneos sob luz ultravioleta para detectar *Anaplasma* spp. (Potgieter & Stoltz 1994).

### CONCLUSÃO

O principal objetivo deste estudo foi alcançado ao encontrarem-se duas colorações histoquímicas (de fácil utilização), Azul de Metileno e Azul de Toluidina, que permitiram a evidenciação nítida dos organismos intraeritrocitários e se mostraram mais eficazes que a técnica de HE. Estas técnicas permitiram observar características morfológicas auxiliares no diagnóstico principalmente de babesiose bovina por *B. bovis*, mas também permitiram o diagnóstico diferencial de babesiose por *B. bigemina* e anaplasiose por *A. marginale*. Adicionalmente, analisaram-se vários parâmetros clínico-epidemiológicos e anatomopatológicos importantes no diagnóstico de babesiose causada por *B. bovis*.

### REFERÊNCIAS

- Almeida M.B., Tortelli F.P., Riet-Correa B., Ferreira J.L.M., Soares M.P., Farias N.A.R., Riet-Correa F. & Schild A.L. 2006. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. *Pesq. Vet. Bras.* 26(4):237-24.
- Antoniassi N.A.B., Corrêa A.M.R., Santos A.S., Pavarini S.P., Sonne L., Bandarra P.M. & Driemeier D. 2009. Surto de babesiose cerebral em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural.* 39(3):933-936.
- Barros C.S.L., Driemeier D., Dutra I.S. & Lemos R.A.A. 2006. Doenças do sistema nervoso de bovinos no Brasil, p.87-95. 1ª ed. Vallée, Montes Claros, MG.
- Brasil. 2005. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Brasília, DF. 112 p.
- Behmer O.A., Tolosa E.M.C. & Neto A.G.F. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. Edart, São Paulo.
- Callow L.L. & McGavin M.D. 1963. Cerebral babesiosis due to *Babesia argentina*. *Aust. Vet. J.* 39:15-21.
- Costa V.M., Rodrigues A.L., Medeiros J.M.A., Labruna M.B., Simões S.V.D. & Riet-Correa F. 2011. Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* 31(3):239-243.

- Culling C.F.A., Allison R.T. & Barr W.T. 1985. Cellular Pathology Technique. 4th ed. Butterworths, London, UK.
- De Vos A.J. & Potgieter F.T. 1994. Bovine babesioses. In: Coetzer J.A.W, Thomson G.R. & Tustin R.C., Infectious Disease of Livestock With Special Reference to Southern Africa. V.1. Oxford University Press, Cape Town, Southern Africa, p.278-294.
- Farias N.A. 2007. Tristeza parasitária bovina, p. 524-532. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.1. 3ªed. Pallotti, Santa Maria.
- Figuera R.A. & Graça D.L. 2010. Sistema hematopoiético. In: Santos R.L. & Alessi A.C. (Eds), Patologia Veterinária. Roca, São Paulo.
- Figuera R.A. 2001. Anemia em Medicina Veterinária, p. 65-71. Santa Maria.
- Gardiner C.H., Fayer R. & Dubey J.P. 1998. An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissue, p. 71-72. 2ª ed. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC.
- Kessler R.H., Madruga C.R., Schenk M.A.M. & Ribeiro O.C. 1983. Babesiose cerebral por *Babesia bovis* (Babés 1888 Starcovici 1893) em bezerros, no estado de Mato Grosso do Sul. Pesq. Agropec. Bras. 18(8):931-933.
- Maxie M.G. & Miller M.A. 2016. Introduction to the diagnostic process. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's. Pathology of Domestic Animals: Vol.1, 6<sup>th</sup> ed. Elsevier, Missouri.
- McAdam A.J. & Sharpe A.H. Infectious Diseases. 2005. In: Robbins S.L. & Cotran R.S. Pathologic Basis of Disease. 7<sup>th</sup> ed. Elsevier Saunders.
- Néo T.A., Giglioti R., Obregón D., Bilhassi T.B., Oliveira H.N., Machado R.Z., Aníbal F.F., Brito L.G., Malagó Jr.W., Bressani F.A., Oliveira M.C.S. 2016. Detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in endemic areas of São Paulo state, Brazil. Open Journal of Veterinary Medicine. 6:75-84.
- Nevils M.A., Figueroa J.V., Turk J.R., Canto G.J., Ellersieck V.L.M. & Carson C.A. 2000. Cloned lines of *Babesia bovis* differ in their ability to induce cerebral babesiosis in cattle. Parasitol Res. 86:437-443.
- OIE. 2010. Chapter 2.4.2. Bovine Babesiosis. Disponível em <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2008/pdf/2.04.02\\_BOVINE\\_BABESIOSIS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.04.02_BOVINE_BABESIOSIS.pdf)>. Acesso em 24 de maio de 2015.
- Patarroyo J.H., Vargas M.I. & Bicudo P.L. 1982. Description of lesions in cattle in a natural outbreak of *Babesia bovis* infection in Brazil. Vet. Parasitol. 11:301-308.
- Potgieter F.T. & Stoltz W.H. 1994. Bovine anaplasmosis. In: Coetzer J.A.W, Thomson G.R. & Tustin R.C., Infectious Disease of Livestock With Special Reference to Southern Africa. V.1. Oxford University Press, Cape Town, Southern Africa. p.407-430.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H (Eds). 1992. AFIP Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology, Washington, DC. 278p.
- Prozesky L. 1987. Heartwater. The morphology of *Cowdria ruminantium* and its staining characteristics in the vertebrate host and *in vitro*. Onderstepoort J. Vet. Res. 54:173-176.
- Rodrigues A., Rech R.R., Barros R.R., Figuera R.A. & Barros C.S.L. 2005. Babesiose cerebral em bovinos: 20 casos. Ciência Rural. 35(1):121-125.
- Sanches A.W.D., Langohr I.M., Stigger A.L. & Barros C.S.L. 2000. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. Pesq. Vet. Bras. 20(3):113-118.
- Uilenberg G. 2006. Babesia - A historical overview. Vet. Parasitol. 138:3-10.
- Young, A.S.; Morzaria, S.P. 1986. Biology of Babesia. Parasitology Today, v.2, n.8.



Fig.1. Encéfalo, substância cinzenta róseo-cereja. Note o contraste com a substância branca da medula espinhal.



Fig.2. Encéfalo, lobo frontal na altura dos núcleos basais. Contraste da substância cinzenta róseo-cereja com a substância branca.



Fig.3. Rim, superfície capsular vermelho-escura característica de nefrose hemoglobinúrica.



Fig.4. Fígado, aumentado de tamanho (hepatomegalia) e alaranjado.



Fig.5. Fígado, superfície de corte, parênquima difusamente alaranjado devido à bilestase.



Fig.6. Baço, superfície de corte, o parênquima protrai sobre a cápsula indicando esplenomegalia.

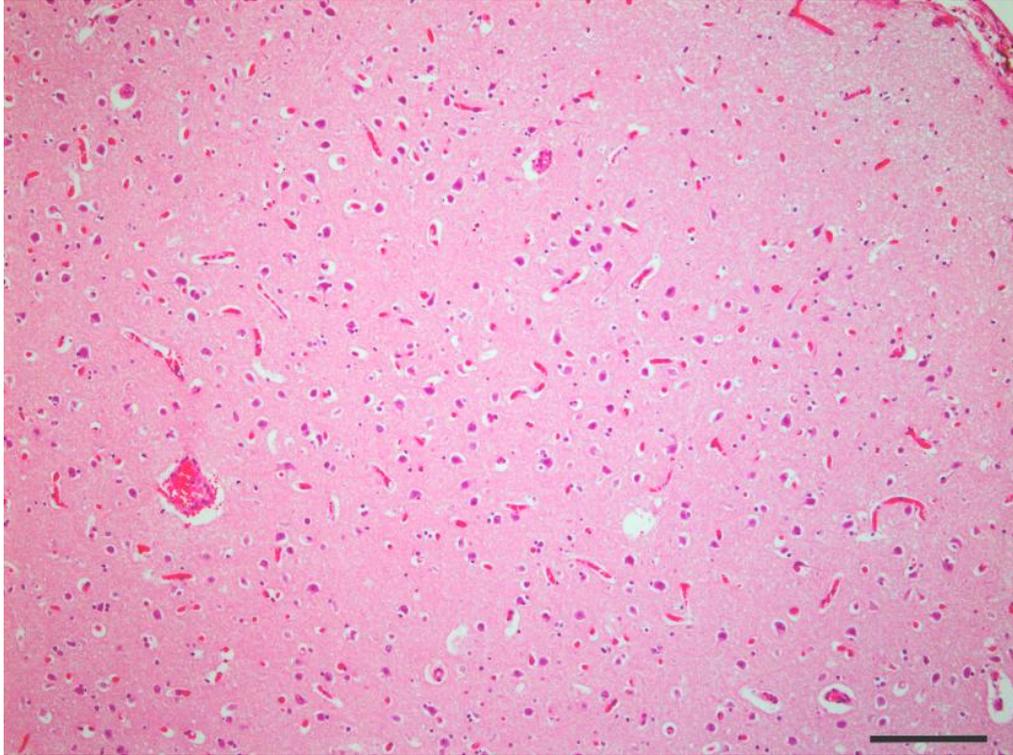


Fig.7. Encéfalo, congestão dos capilares do córtex telencefálico. HE, obj. 10x.

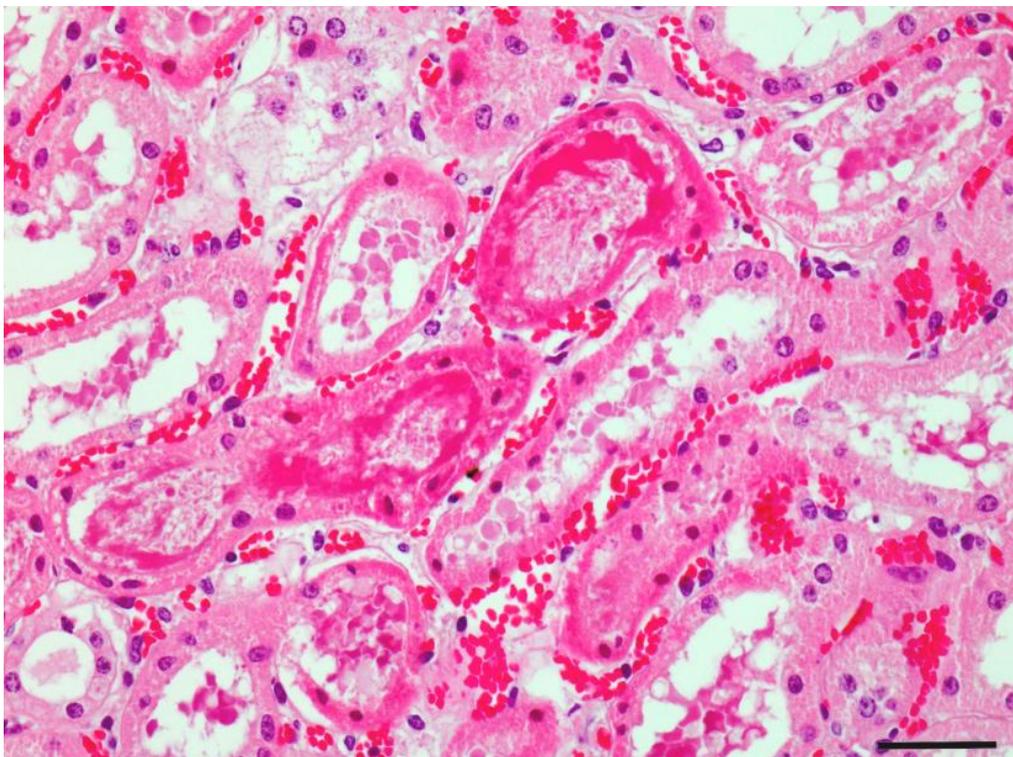


Fig.8. Rim, necrose tubular com formação de cilindros hialinos e de hemoglobina (nefrose hemoglobinúrica) e congestão vascular. HE, obj. 40x.

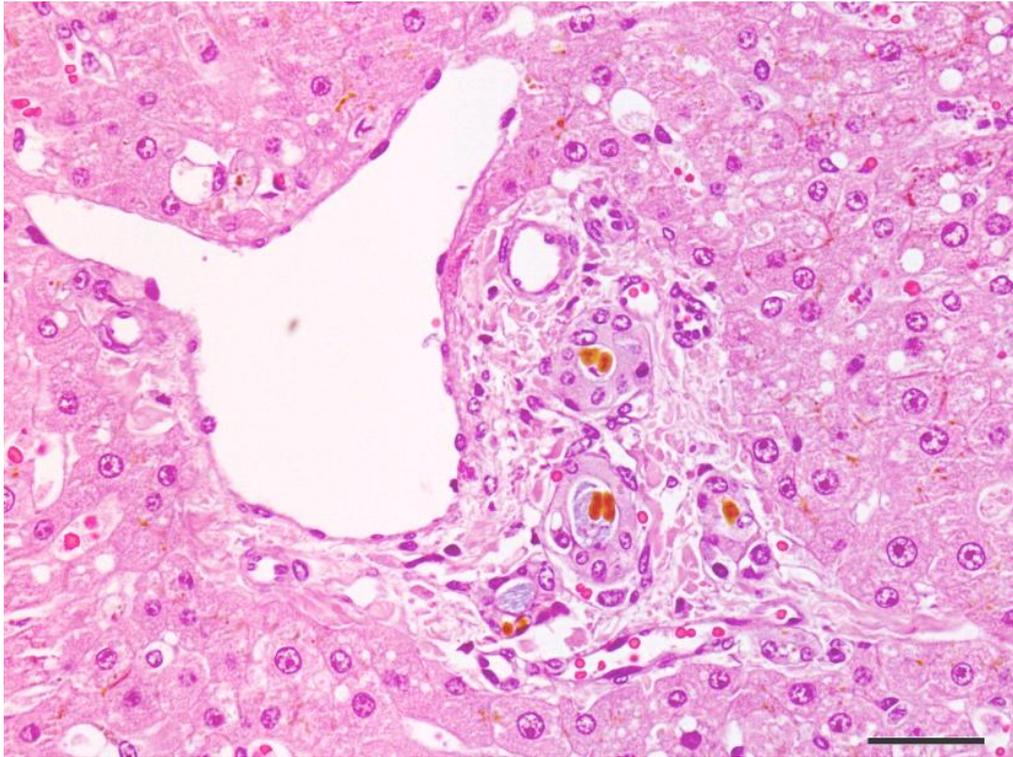


Fig.9. Fígado, bilestase canalicular e ductal. HE, obj. 20x.

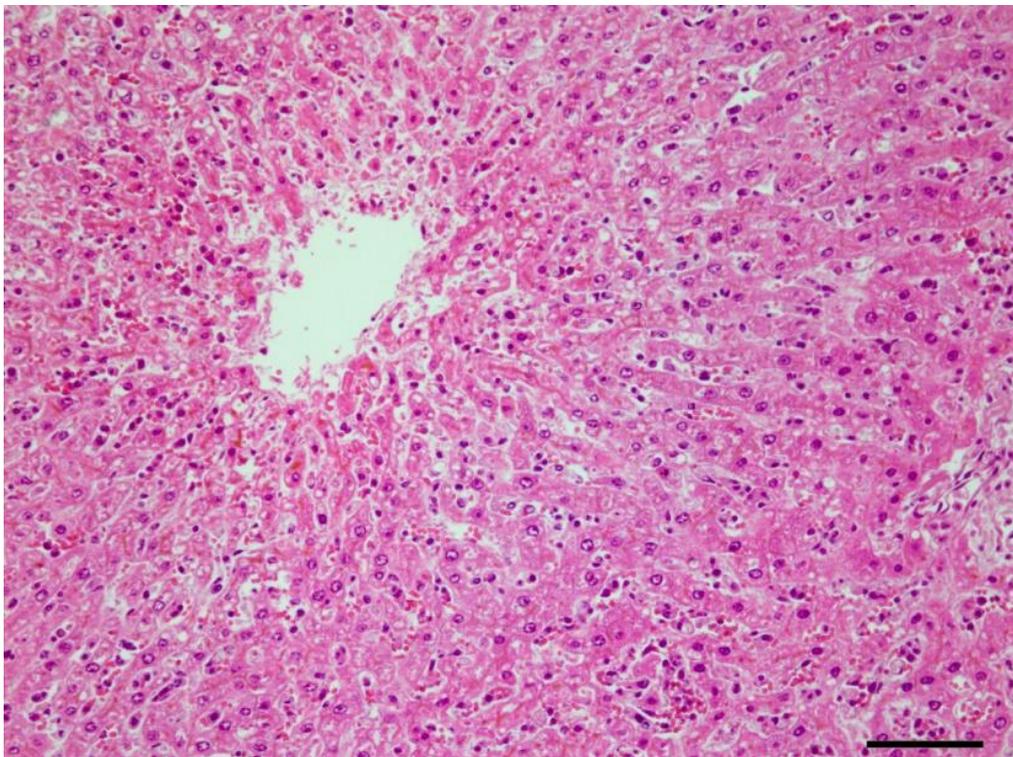


Fig.10. Fígado, necrose e degeneração centrolobular. HE, obj. 20x.

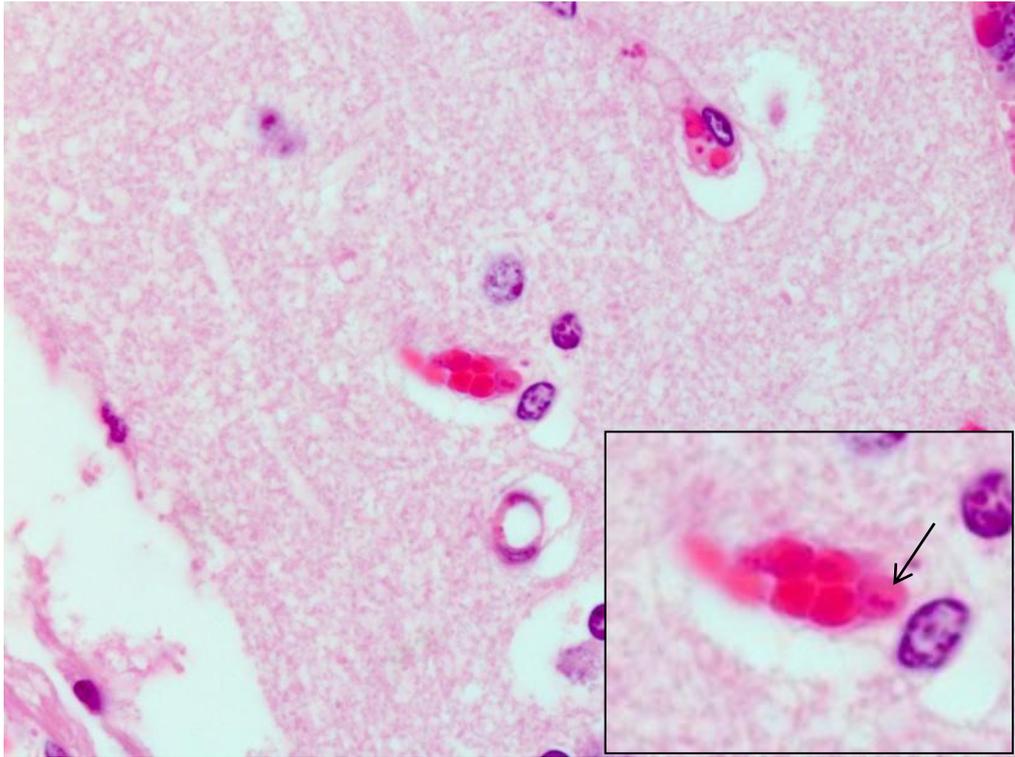


Fig.11. Encéfalo, congestão capilar. No detalhe observe o eritrócito parasitado por *B. bovis* (seta). HE, obj. 100x.

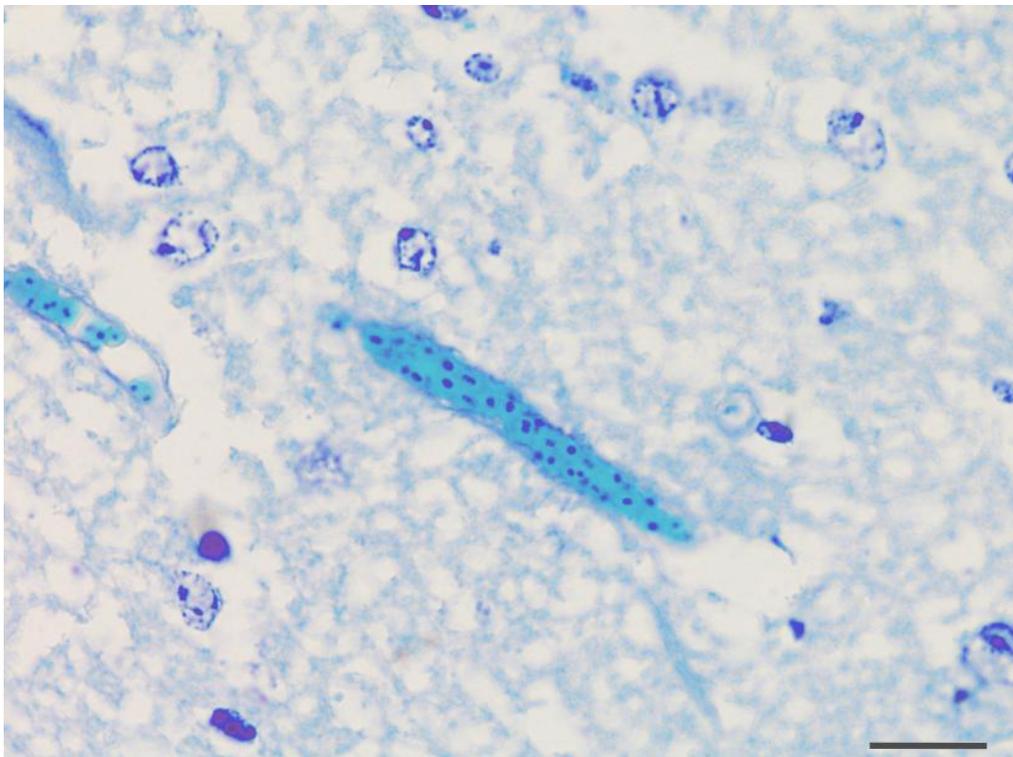


Fig.12. Encéfalo, congestão capilar com numerosos eritrócitos (azul-esverdeados) parasitados por *B. bovis* (azul-escuro), Azul de metileno, obj. 100x.

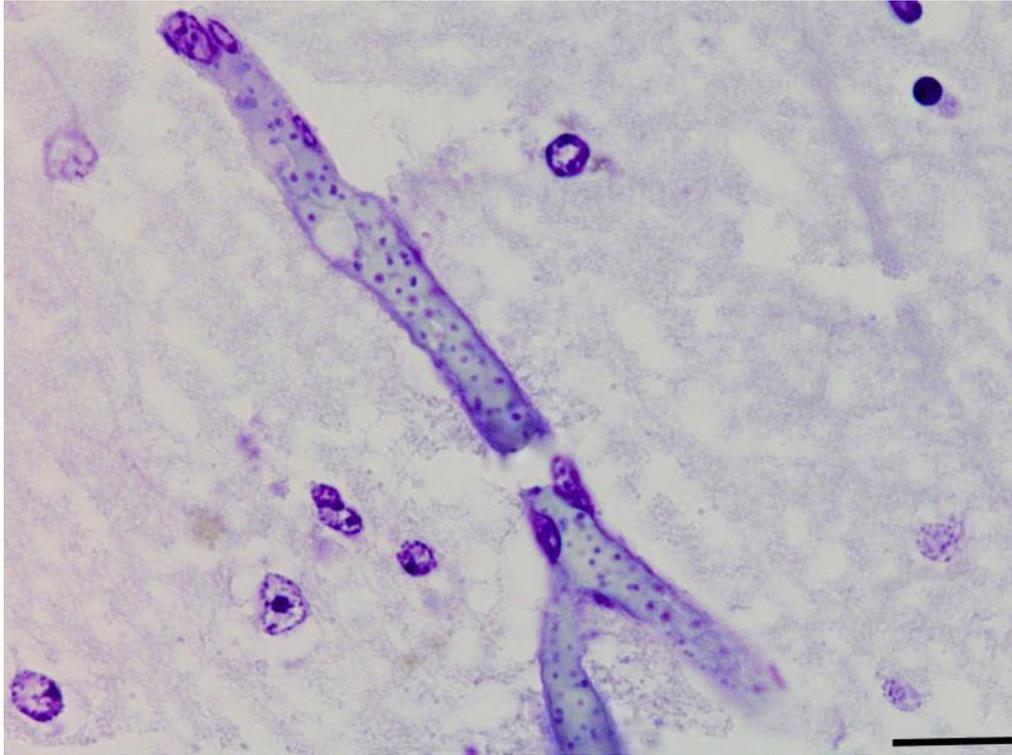


Fig.13. Encéfalo, congestão capilar com numerosos eritrócitos (amarelo-esverdeados) parasitados por *B. bovis* (azul-escuro), Azul de toluidina, obj. 100x.

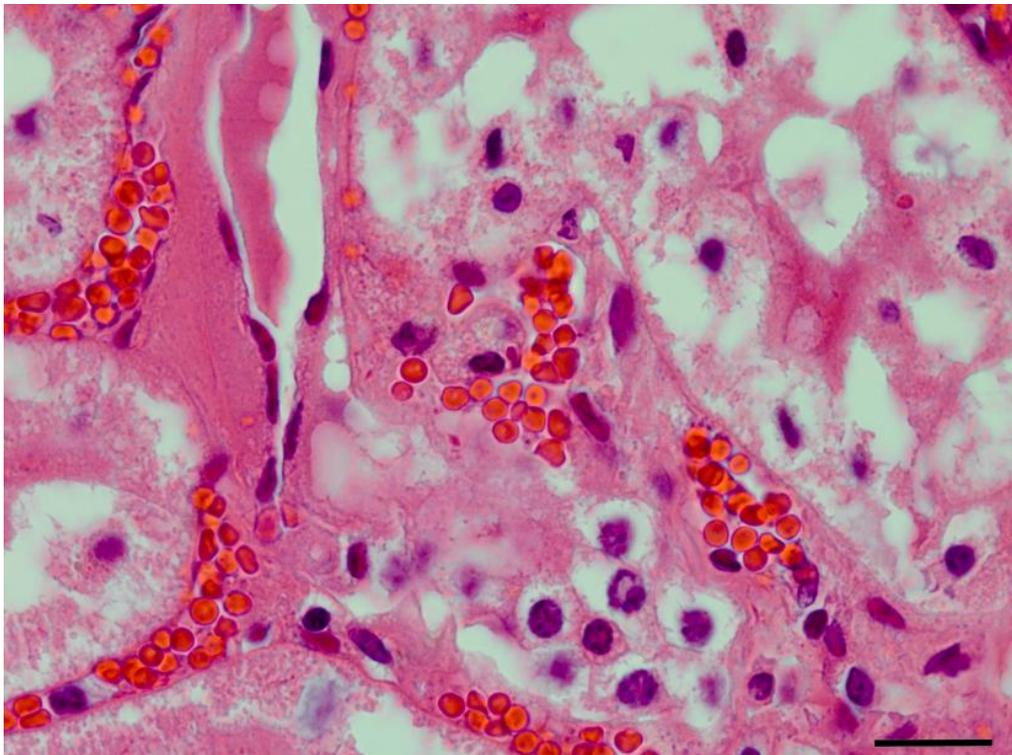


Fig.14. Rim, numerosos eritrócitos nos capilares sanguíneos do interstício (congestão). HE, obj. 100x.

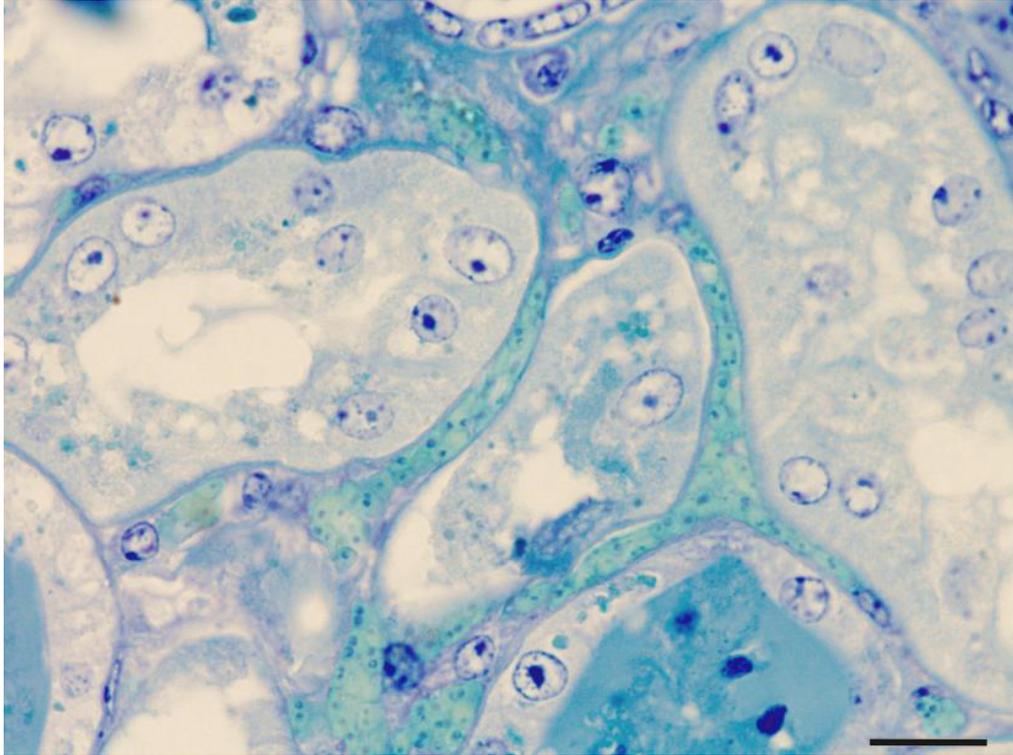


Fig.15. Rim, congestão capilar com numerosos eritrócitos (azul-esverdeados) parasitados por *B. bovis* (azul-escuro), Azul de metileno, obj. 100x.

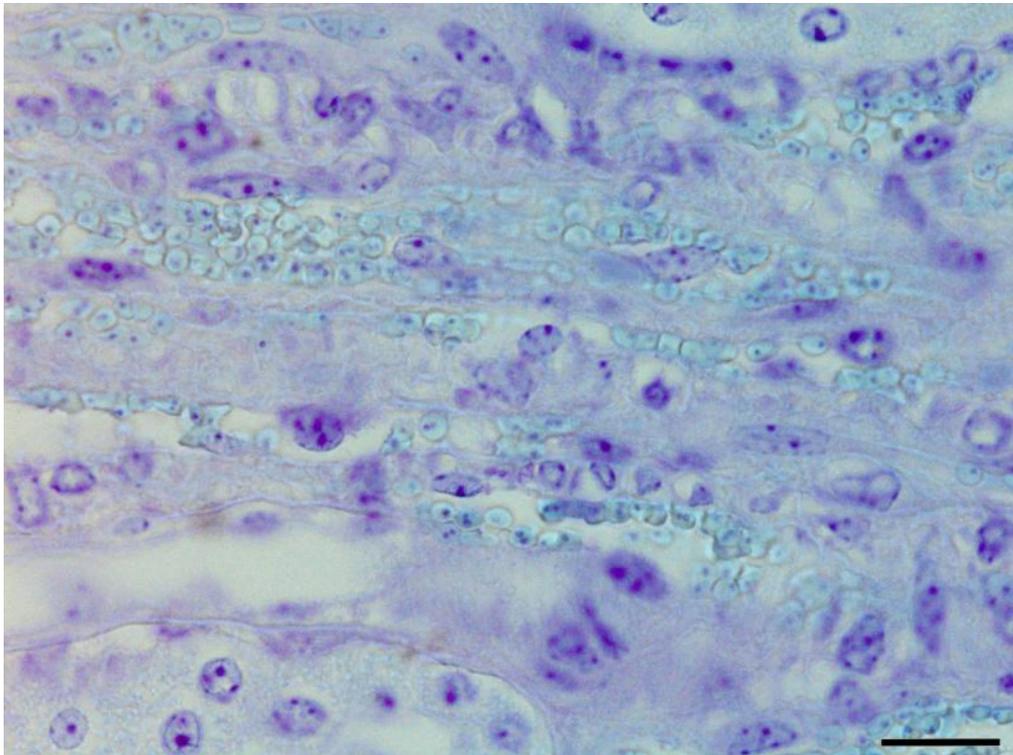


Fig.16. Rim, congestão capilar com numerosos eritrócitos (amarelo-esverdeados) parasitados por *B. bovis* (azul-escuro), Azul de toluidina, obj. 100x.

**Quadro 1. Propriedades histoquímicas da infecção por *Babesia bovis* nos bovinos do grupo A.**

Caso nº	Encéfalo			Rim			Fígado			Baço		
	HE	AM	AT	HE	AM	AT	HE	AM	AT	HE	AM	AT
1	+/-	+	+	+/-	+	+	-	+	+	+/-*	+	+
2	-	+	+	+/-	+/-*	+	+/-	+/-*	+	•	•	•
3	+/-	+	+	+/-*	+	+	+/-*	+	+	•	•	•
4	+/-	+	+	•	•	•	-	+	+	-	+	+
5	+/-	+	+	•	•	•	•	•	•	•	•	•
6	+/-	+	+	•	•	•	•	•	•	•	•	•
7	+/-	+	+	•	•	•	+	+	+/-	+/-	+	+
8	+/-	+	+	•	•	•	•	•	•	•	•	•
9	+/-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
10	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+*	+	+
11	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+*	+*
12	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	-	+/-*	+/-*

•: não remetido. \*: casos em que foi necessário o uso do óleo de imersão na objetiva de 100x. A presença dos micro-organismos foi classificada em positiva (+; quando os protozoários foram facilmente observados), fraca (+/-; quando foram observados protozoários, porém com pouca nitidez) ou negativa (-; quando não foram observados protozoários intraeritrocitários).

**Quadro 2. Propriedades histoquímicas da infecção por *Babesia bovis* nos bovinos do grupo B.**

Caso nº	Encéfalo			Rim			Fígado			Baço		
	HE	AM	AT	HE	AM	AT	HE	AM	AT	HE	AM	AT
1	•	•	•	+/-*	+	+	+*	+	+	-	+	+
2	•	•	•	•	•	•	-	+/-	+	+/-*	+*	+*
3	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-*
4	•	•	•	+/-	+	+	+	+	+	•	•	•
5a	•	•	•	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	-	+	-
6	•	•	•	+/-	+	+	-	+	+*	-	+*	+*
7a	•	•	•	-	+*	+*	-	+*	-	-	+*	-
8	+/-	+	+	•	•	•	-	+*	+*	-	+*	+*
9	•	•	•	+/-*	+/-*	+/-*	+*	+/-*	+/-*	•	•	•
10	•	•	•	•	•	•	+/-	+	+	+/-	+/-	+/-
11	•	•	•	+/-	+	+*	+/-	+*	+*	•	•	•
12	•	•	•	+/-*	+	+	-	+/-*	+	•	•	•
13	+/-	+*	+*	•	•	•	-	+	+	•	•	•
14	+/-*	+/-*	+	+/-*	+/-*	+	-	+/-*	+*	+/-*	+/-*	+*
15	+/-	+/-*	+	-	+*	+	-	+/-*	+*	•	•	•
16b	•	•	•	+/-*	+/-*	+*	+/-*	+/-*	+*	•	•	•
17b	-	+*	+*	•	•	•	+/-*	+/-*	+*	+/-*	+*	+*
18	•	•	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	•	•	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	•	•	•	•	•	•	-	-	-	•	•	•
21	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	-	+	+*
22	•	•	•	-	+*	+*	•	•	•	-	-	-
23	•	•	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24a	•	•	•	+/-*	+*	+*	+/-	+*	-	-	-	-
25	•	•	•	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	•	•	•	-	-	-	-	-	-	•	•	•
27	•	•	•	•	•	•	-	+/-*	+/-*	•	•	•
28	•	•	•	-	+	+	-	+	+	-	+	+
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	•	•	•
30	•	•	•	-	-	-	-	-	-	•	•	•
31b	•	•	•	-	+*	+*	+/-*	+*	+*	•	•	•
32	•	•	•	•	•	•	+/-	+	+	•	•	•
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	•	•	•	•	•	•	+/-	+	+	•	•	•
35	•	•	•	•	•	•	•	•	•	-	+*	+/-*
36	•	•	•	•	•	•	-	+*	+*	-	-	-
37b	•	•	•	-	+	+	-	+	+	-	+/-	+/-
38a	+/-*	+	+	+/-*	+	+	+/-*	+	+	+/-*	+	+

•: não remetido; \*: casos em que foi necessário o uso da imersão. A presença dos micro-organismos foi classificada em positiva (+; quando os protozoários foram facilmente observados), fraca (+/-; quando foram observados protozoários, porém com pouca nitidez) ou negativa (-; quando não foram observados protozoários intraeritrocitários); a: correspondem aos casos de *Babesia bigemina*; b: correspondem aos casos de *Anaplasma* spp..

## 4 CONCLUSÃO

O principal objetivo deste estudo foi alcançado ao encontrar-se duas colorações histoquímicas (de fácil utilização), Azul de Metileno e Azul de Toluidina, que permitiram a evidenciação nítida dos organismos intraeritrocitários e se mostraram mais eficazes que a técnica de HE. Estas técnicas permitiram observar características morfológicas e tintoriais auxiliares no diagnóstico principalmente de babesiose bovina por *B. bovis*, mas também permitiram o diagnóstico diferencial de babesiose por *B. bigemina* e anaplasiose por *A. marginale*. Adicionalmente, evidenciaram-se vários parâmetros clínico-epidemiológicos e anatomopatológicos importantes no diagnóstico de babesiose causada por *B. bovis*.

## REFERÊNCIAS

- ARMÍÉN, A. G., TOKARNIA, C. H., PEIXOTO, P. V. & FRESE, K. **Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats induced by *Ipomoea carnea* subsp *fistulosa* (Convolvulaceae)**. Veterinary Pathology. v.44, n.2, p.170–184, 2007.
- BARROS, C. S. L.; FIGHERA, R. A. **Babesiosis**. In: Brown C.; Torres A. (Eds). Foreign Animal Diseases. 7<sup>th</sup> ed. Boca Publications Group, Boca Raton. p.147-157. 2008.
- BAZZI, T. et al. **Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.36, p.303-311, 2016.
- BONOLDI, V. L. N. **Estudo laboratorial de agentes infecciosos transmitidos por carrapatos em pacientes com Doença de Lyme-símile brasileira (Síndrome Baggio-Yoshinari)**. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, 2009.
- CULLEN, J. M.; BROWN, D. L. **Sistema Hepatobiliar e Pâncreas Exócrino**. In: Zachary J.F.; McGavin M.D. (Eds). Bases da Patologia em Veterinária. 5ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier. p.407, 2013.
- GALIZA, G. J. N. et al. 2014. **Características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico da criptococose em animais de companhia**. Pesq. Vet. Bras. v.34, n.3, p.261-269.

HENRIQUES, F. G. **Manifestações neurológicas da malária.** Arquivos Neuro-psiquiatria, v. 30, n.4, 1972.

KESSLER R. H.; SCHENK M. A. M. Ed. **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos.** Campo Grande, Embrapa, CNPGC, 157p. 1998.

KESSLER, R. H. et al. **Tristeza Parasitária dos Bovinos: Quando Vacinar é Preciso. Documentos 131.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. 27 p. 2002.

LEAL, J. S. et al. **Diagnósticos de babesiose cerebral bovina realizados no SPVUFRGS entre 1996 e 2004.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.57(Supl.), n.75. 2005

LILLIE, R. D.; PIZZOLATO, P. **The Aldehyde Reaction with Bilirubin of Bile and of Bile Pigment in the Icteric Liver.** Virchows Arch. Abt. A Path. Anat., v.350, p.52-60, 1970.

LUCENA, R. B. et al. **Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos.** Pesq. Vet. Bras. v.30, n.5, p.428-434, 2010.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. **Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae).** Systematic Parasitology, v.56, p.169-172, 2003.

SCHNITTGER, L. et al. **Babesia: A world emerging.** Infection, Genetics and Evolution, v.12, p.1788–1809, 2012.

SILVA, J. B. **Ocorrência sorológica de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em bovinos e bubalinos no estado do Pará, Brasil.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v.35, n.5, p.2495-2500, 2014.

VILORIA, M. I. V.; SALCEDO, J. H. P. **Patofisiologia da infecção por *Babesia bovis*.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.13, suplemento 1, p.48-52, 2004.

YABSLEY, M. J.; SHOCK, B. C. **Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs.** International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, v.2, p.18-31, 2013.