



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR
ANAPLASMA MARGINALE, *BABESIA BOVIS* E *BABESIA
BIGEMINA* EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA**

MARIANA DA SILVA CASA

LAGES, 2017

MARIANA DA SILVA CASA

PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR *ANAPLASMA MARGINALE*, *BABESIA BOVIS* E *BABESIA BIGEMINA* EM BOVINOS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Joandes Henrique Fonteque.

LAGES

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Casa, Mariana da Silva
Prevalência e fatores associados à infecção por
Anaplasma marginale, Babesia bovis e Babesia
bigemina em bovinos da raça Crioula Lageana /
Mariana da Silva Casa. - Lages , 2017.
130 p.

Orientador: Joandes Henrique Fonteque
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2017.

1. Anaplasmoses. 2. Babesioses. 3. Raça nativa. 4.
PCR. 5. Hematologia. I. Fonteque, Joandes Henrique.
II. Universidade do Estado de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação. III. Título.

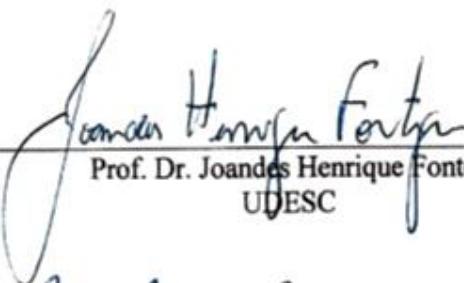
MARIANA DA SILVA CASA

PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR *ANAPLASMA MARGINALE*, *BABESIA BOVIS* E *BABESIA BIGEMINA* EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca Examinadora:

Orientador:


Prof. Dr. Joandes Henrique Fonteque
UDESC

Membros:


Prof. Dr. Luiz Cláudio Milette
UDESC


Dr. João Ricardo de Souza Martins
IPVDF

Lages, 08/12/2017.

Dedico este trabalho à meus pais,
Sara e Volmir, ao meu marido
Ruan, à minha irmã Manuela e à
minha tia Teka.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela vida, pela família maravilhosa, e pelos milagres com os quais me deparei a cada dia desta caminhada.

A meus pais, Volmir Luiz Casa e Sara Renata da Silva Casa, pelo amor incondicional e carinho, apoio, paciência, encorajamento, por me ensinarem a respeitar a mim mesma, aos meus limites e aos demais que convivem comigo, e tudo o mais que me ensinaram, fizeram, fazem e continuarão fazendo por mim e que não encontro palavras para explicar o amor imenso que dedico a eles.

À minha irmã Manuela da Silva Casa, por sua generosidade, seu carinho.

À minha tia Teresinha Aparecida da Silva, a tia “Teka”, pelos sábios conselhos e preocupação e por ser uma segunda mãe para nós. Sei que continua olhando por nós do seu lugar no céu.

Ao meu marido Ruan Caldart, por todo amor e carinho, pela compreensão, pela companhia em todos os momentos, por toda a ajuda e cumplicidade. Tenho sorte em tê-lo ao meu lado.

Ao meu orientador, professor Joandes Henrique Fonteque, pela oportunidade, pelos ensinamentos, por toda ajuda e pela amizade. Deus coloca sempre as pessoas certas em nosso caminho.

Aos amigos que fiz nesta jornada, que foram essenciais e tornaram mais leve o caminho para se chegar até aqui. Jackson Schade, João Ricardo Kunz, Anderson Fernando de Souza, Marilia Gabriela Luciani, Paulo Ricardo Benetti Todeschini, Maysa Garlet Nunes Xavier, Ketriane Mota de Souza, Renata Palacios, obrigada pela ajuda, por estarem comigo em tantas viagens, em tantas noites e fins de semana no laboratório, e principalmente por compartilharem sua amizade! Obrigada!

Aos professores que estiveram sempre doando um pouco de seu tempo para que nosso trabalho fosse melhor, tirando dúvidas e ajudando no que fosse preciso, agradeço especialmente ao professor Dr. Luiz Claudio Milette, à professora Dra. Carla Ivane Ganz Vogel e à professora Dra. Julieta Volpato. À Dra. Luciana Gatto pelas dicas, orientações e fornecimento dos controles positivos e primers para este trabalho.

Aos graduandos que estiveram sempre presentes para ajudar em todos os momentos e por quem criei um carinho especial. Temos sorte em ter uma equipe engajada e amiga como vocês. Obrigada Júlio de Matos Vettori, Milena Carol Sbrussi Granella, Rubens Peres Mendes,

Laura Muniz Arruda Pereira, Marina Sohn Kühl, Jônatas Carissimi Lovatel, Sara da Rosa Eing e Bárbara Sabei. Vocês são grandes companheiros!

Agradeço ainda aos criadores dos bovinos da raça Crioula Lageana, na Fazenda Igrejinha o proprietário Sr. Nelson de Araújo Camargo; na Fazenda Bom Jesus do Herval, os proprietários Edison Martins e Vera Maria Villamil Martins; na Fazenda da Cadeia o proprietário Márcio Rosa Camargo; na Fazenda Canoas, o proprietário Assis Almeida Camargo; na Fazenda Santa Rita do Passo da Telha, o proprietário José Antônio Ribas Ribeiro; e na Fazenda Grande, o proprietário Jairo Roberto Duarte, que gentilmente cederam seus animais e a quem presto meu reconhecimento pelo trabalho que realizam.

A toda equipe do Laboratório de Patologia Clínica do CAV – UDESC.

Aos colegas e professores do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores do CAV-UDESC.

À todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste projeto.

À Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - PPGCA pela realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de apoio financeiro.

À Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC pela parceria no projeto de pesquisa, em especial ao prof. Dr. Marcio Cinachi Pereira, ao prof. Dr. José Antônio Ribas Ribeiro, ao Dr. Edison Martins, ao prof. Dr. Renato Irgang, à profa. Dra. Sandra Regina de Souza, ao prof. Dr. André Luís Ferreira Lima e ao prof. Dr. Sérgio Augusto Ferreira de Quadros.

E à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina - FAPESC por fomentar este trabalho de pesquisa.

Obrigada!

[...] Afastai de mim a ideia de que tudo posso. Dai-me a força, a vontade e a ocasião de ampliar cada vez mais meus conhecimentos. Hoje, eu posso descobrirem meu saber, coisas que não suspeitava ontem, pois a arte é grande, mas o espírito do homem penetra sempre mais adiante.

Moïse Maïmonide, *A prece do médico*

RESUMO

CASA, M. S. 2017, 130p. **Prevalência e fatores associados à infecção por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da raça Crioula Lageana.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

Estudos sobre o comportamento das infecções por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* são vastos, no entanto estudos de prevalência e alterações hematológicas causadas por estes agentes em raças nativas são escassos, sendo que na raça Crioula Lageana não existe nenhum trabalho que aborde estes aspectos. Sendo assim, realizou-se a coleta de amostras sanguíneas de 311 animais da raça Crioula Lageana, separados por sexo e categorias, e procedeu-se a extração de DNA e posteriormente a PCR, com primers específicos para a detecção dos agentes causadores da anaplasmosse e babesiose em bovinos. Para todos os animais aferiu-se a frequência cardíaca, frequência respiratória, motilidade ruminal, exame de coloração das mucosas e temperatura retal. Para avaliação das variáveis hematológicas realizou-se o hemograma e a determinação da concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático. Aplicou-se ainda questionário epidemiológico à todos os criadores da raça de modo a estabelecer os fatores associados à infecção nesta população. A análise estatística consistiu na aplicação do teste de qui-quadrado para verificação da associação entre o sexo e as categorias com a positividade ou não para os agentes. O teste t, para dados paramétricos ou o teste de Mann-Whitney, para os dados não paramétricos, foram utilizados para verificar as diferenças nas médias das variáveis clínicas e hematológicas de animais positivos e negativos. A prevalência obtida para *A. marginale* foi alta, colocando esta população em situação de estabilidade enzoótica para este agente. Os fatores associados à infecção por *A. marginale* foram a finalidade produtiva da criação, a regularidade no controle de carrapatos, os acaricidas usados e a categoria mais infestada por carrapatos. Para *B. bovis* obteve-se prevalência próxima ao limite de estabilidade, com a finalidade produtiva da criação reprodução, o contato com outras espécies animais, a regularidade do controle de carrapatos e a época de emprego dos tratamentos para os carrapatos e para a babesiose como fatores associados. Para *B. bigemina* a prevalência baixa coloca os animais em situação de instabilidade para o agente, e os fatores associados à infecção foram o contato com outras espécies animais e a regularidade da assistência veterinária. As variáveis clínicas não sofreram alterações entre animais positivos e negativos para qualquer dos agentes. A presença ou não do agente da anaplasmosse não causa alterações nas variáveis hematológicas em bovinos da raça Crioula Lageana, enquanto a presença dos agentes da babesiose pode levar à leucocitose com linfocitose.

Palavras-chave: Babesiose. Anaplasmosse. Raça Nativa.

ABSTRACT

CASA, M. S. 2017. 130p. **Prevalence and associated factors with *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in Crioulo Lageano cattle.** Dissertation (Masters in Animal Science) - Santa Catarina State University. Post Graduate Program in Animal Science, Lages, 2017.

There are many studies about the aspects of infections by *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle, however prevalence studies and hematological alterations caused by these agents in native breeds are scarce, and in Crioula Lageana breed there is no works that addresses these aspects. Thus, blood samples were collected from 311 Crioula Lageana animals, separated by sex and categories and proceeded DNA extraction and subsequent PCR with specific primers for the detection of the causative agents of anaplasmosis and babesiosis in cattle. For all animals, heart rate, respiratory rate, ruminal motility and rectal temperature were measured. To evaluate hematological variables hemogram was performed in addition to determination of total plasma protein and plasma fibrinogen concentration. An epidemiological questionnaire was also applied to all breeders in order to establish the factors associated with the infection in this population. The statistical analysis consisted of the application of the chi-square test to verify the association between sex and the categories with or without positivity for the agents. The t-test for parametric data or the Mann-Whitney test for non-parametric data were used to verify the differences in the means of the clinical and hematological variables of positive and negative animals. The prevalence obtained for *A. marginale* was high, placing this population in a situation of enzootic stability for this agent. The factors associated with *A. marginale* infection were the productive purpose of breeding, regularity in tick control, used acaricides and the category most infested by ticks. For *B. bovis* it was obtained prevalence near the limit of stability, with the productive purpose of breeding, contact with other animal species, regularity of tick control and the time of use of tick and babesiosis treatments as associated factors. For *B. bigemina* the low prevalence places the animals in a situation of instability for the agent and the factors associated with the infection were contact with other animal species and the regularity of veterinary care. The clinical variables did not change between positive and negative animals for any of the agents. The hematological evaluation revealed that the presence or not of the anaplasmosis agent does not cause changes in the hematological variables of the Crioula Lageana breed, while the presence of babesiosis agents can lead to leukocytosis with lymphocytosis.

Palavras-chave: Babesiosis. Anaplasmosis. Native breed.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Prevalência de <i>A. marginale</i> em 311 bovinos da raça Crioula Lageana, determinada pela técnica de PCR, no estado de Santa Catarina, Brasil	60
Gráfico 2– Percentual de animais parasitados por <i>A. marginale</i> detectados pela técnica de PCR, da raça Crioula Lageana de acordo com o sexo, sendo 249 fêmeas e 50 machos, no estado de Santa Catarina, Brasil	61
Gráfico 3 – Percentual de bovinos parasitados por <i>A. marginale</i> pela técnica de PCR, da raça Crioula Lageana de acordo com a categoria, sendo 32 touros, 66 novilhas, 141 vacas e 72 bezerros, no estado de Santa Catarina, Brasil	62
Gráfico 4 - Prevalência de <i>B. bovis</i> em 311 bovinos da raça Crioula Lageana, por meio da técnica de PCR no estado de Santa Catarina, Brasil.....	76
Gráfico 5 - Percentual de animais parasitados por <i>B. bovis</i> da raça Crioula Lageana de acordo com o sexo, sendo 249 fêmeas e 50 machos, pela técnica de PCR em Santa Catarina, Brasil.	77
Gráfico 6 - Percentual de animais parasitados por <i>B. bovis</i> da raça Crioula Lageana de acordo com a categoria, sendo 32 touros, 66 novilhas, 141 vacas e 72 bezerros, pela técnica de PCR em Santa Catarina, Brasil	78
Gráfico 7 - Prevalência da infecção por <i>Babesia bigemina</i> em 311 bovinos da raça Crioula Lageana, determinada pela técnica de PCR, no estado de Santa Catarina, Brasil	92
Gráfico 8 - Percentual de animais parasitados por <i>B. bigemina</i> detectados pela técnica de PCR, da raça Crioula Lageana de acordo com o sexo, sendo 249 fêmeas e 50 machos, no estado de Santa Catarina, Brasil	93
Gráfico 9 - Percentual de bovinos parasitados por <i>B. bigemina</i> , por meio da técnica de PCR, da raça Crioula Lageana de acordo com a categoria, sendo 32 touros, 66 novilhas, 141 vacas e 72 bezerros, no estado de Santa Catarina, Brasil	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise univariada dos fatores associados à infecção por <i>A. marginale</i> determinada pela técnica de PCR para bovinos da raça Crioula Lageana.	62
Tabela 2 - Análise multivariada dos fatores associados à infecção por <i>A. marginale</i> detectados por meio da PCR em bovinos da raça Crioula Lageana.	64
Tabela 3 - Análise univariada dos fatores associados à infecção por <i>B. bovis</i> em bovinos da raça Crioula Lageana.	78
Tabela 4 - Análise multivariada dos fatores associados à infecção por <i>B. bovis</i> em bovinos da raça Crioula Lageana.	80
Tabela 5 - Análise univariada dos fatores associados à infecção por <i>B. bigemina</i> em bovinos da raça Crioula Lageana.	94
Tabela 6 - Análise multivariada dos fatores associados à infecção por <i>B. bigemina</i> em bovinos da raça Crioula Lageana.	96
Tabela 7 - Médias e Desvios-padrão do resultado do hemograma, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático de 311 animais da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por <i>A. marginale</i>	109
Tabela 8 - Médias e Desvios-padrão do resultado do hemograma, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático de 311 animais da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por <i>Babesia bovis</i>	117
Tabela 9 - Médias e Desvios-padrão do resultado do hemograma, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático de 311 animais da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por <i>Babesia bigemina</i>	118

LISTA DE ABREVIATURAS

CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FC	Frequência Cardíaca
FR	Frequência Respiratória
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
MR	Motilidade Ruminal
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTP	Proteína Total Plasmática
TR	Temperatura Retal
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
VGM	Volume globular médio
VG	Volume Globular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivos Específicos.....	33
3 HIPÓTESES.....	35
4 REVISÃO DE LITERATURA	37
4.1 ANAPLASMOSE	37
4.1.1 Etiologia	37
4.1.2 Epidemiologia.....	37
4.1.3 Patogenia e Sinais Clínicos	38
4.1.4 Vetores e Transmissão.....	39
4.1.5 Diagnóstico	39
4.1.6 Alterações Hematológicas na Anaplasmose	40
4.2 BABESIOSE.....	40
4.2.1 Etiologia	40
4.2.1.1 <i>Babesia Bovis</i>	40
4.2.1.2 <i>Babesia Bigemina</i>	41
4.2.2 Epidemiologia.....	41
4.2.3 Patogenia e Sinais Clínicos	42
4.2.4 Vetores e Transmissão.....	42
4.2.5 Diagnóstico	43
4.2.6 Alterações Hematológicas na Babesiose	44
4.3 A RAÇA CRIOULA LAGEANA	44
4.4 EFEITO DA RAÇA SOBRE A RESPOSTA ÀS INFECÇÕES POR <i>BABESIA</i> SPP. E <i>ANAPLASMA MARGINALE</i>	45
REFERÊNCIAS.....	47
5 PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR <i>ANAPLASMA MARGINALE</i> EM BOVINOS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA	55
5.1 INTRODUÇÃO	56
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	57
5.2.1 Determinação do tamanho amostral	57
5.2.2 Animais e obtenção das amostras	57

5.2.3 Exame Físico	58
5.2.4 Extração de DNA	58
5.2.5 Análise molecular	58
5.2.6 Fatores Associados	59
5.2.7 Análise Estatística	59
5.2.8 Comitê de Ética	59
5.3 RESULTADOS.....	60
5.4 DISCUSSÃO	64
5.5 CONCLUSÃO	67
5.6 REFERÊNCIAS.....	67
6 PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR <i>BABESIA BOVIS</i> EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA	71
6.1 INTRODUÇÃO	72
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS	72
6.2.1 Determinação do tamanho amostral	72
6.2.2 Animais e obtenção das amostras	73
6.2.3 Exame Físico	73
6.2.4 Extração de DNA	74
6.2.5 Análise molecular.....	74
6.2.6 Fatores Associados	75
6.2.7 Análise Estatística	75
6.2.8 Comitê de Ética	75
6.3 RESULTADOS.....	75
6.4 DISCUSSÃO	80
6.5 CONCLUSÃO	83
6.6 REFERÊNCIAS.....	83
7 PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR <i>BABESIA BIGEMINA</i> EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA	87
7.1 INTRODUÇÃO	88
7.2 MATERIAIS E MÉTODOS	88
7.2.1 Determinação do tamanho amostral	88
7.2.2 Animais e obtenção das amostras	89
7.2.3 Exame Físico	89
7.2.4 Extração de DNA	90
7.2.5 Análise molecular.....	90
7.2.6 Fatores Associados	91

7.2.7 Análise Estatística	91
7.2.8 Comitê de Ética	91
7.3 RESULTADOS.....	91
7.4 DISCUSSÃO	97
7.5 CONCLUSÃO	99
7.6 REFERÊNCIAS.....	99
8 ALTERAÇÕES CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA NATURALMENTE INFECTADOS POR ANAPLASMA MARGINALE	105
8.1 INTRODUÇÃO	106
8.2 MATERIAIS E MÉTODOS	106
8.2.1 Animais e obtenção das amostras	106
8.2.2 Exame Físico	106
8.2.3 Avaliação hematológica	107
8.2.4 Extração de DNA e análise molecular.....	107
8.2.5 Análise Estatística	108
8.2.6 Comitê de Ética	108
8.3 RESULTADOS.....	108
8.3.1 Exame clínico	108
8.3.2 Avaliação hematológica	109
8.4 DISCUSSÃO	109
8.5 CONCLUSÃO	111
8.6 REFERÊNCIAS.....	111
9 ALTERAÇÕES CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA NATURALMENTE INFECTADOS POR BABESIA BOVIS E BABESIA BIGEMINA	113
9.1 INTRODUÇÃO	114
9.2 MATERIAIS E MÉTODOS	114
9.2.1 Animais e obtenção das amostras	114
9.2.2 Exame Físico	114
9.2.3 Avaliação hematológica	115
9.2.4 Extração de DNA e análise molecular.....	115
9.2.5 Análise Estatística	116
9.2.6 Comitê de Ética	116
9.3 RESULTADOS.....	116
9.3.1 Exame clínico	117

9.3.2 Avaliação hematológica	117
9.4 DISCUSSÃO	118
9.5 CONCLUSÃO	120
9.6 REFERÊNCIAS.....	120
10 CONCLUSÃO.....	123
ANEXOS.....	125

1 INTRODUÇÃO

A anaplasmosse e babesiose bovinas, causadas pelos agentes *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, respectivamente, são enfermidades economicamente importantes em todo o mundo, sendo que os maiores prejuízos ocorrem nos países subdesenvolvidos. São doenças causadoras de alta morbidade e mortalidade nos rebanhos e dessa forma geram custos elevados com tratamento e óbito de animais.

O principal vetor das doenças é o carrapato *Rhipicephalus microplus*, e o seu controle inadequado pode levar à ocorrência da anaplasmosse e da babesiose na forma de surtos, com altos índices de mortalidade. Por este motivo, a manutenção da população de carapatos em níveis aceitáveis é uma das formas de controlar surtos, mantendo os animais constantemente parasitados e com imunidade contra os hemoparasitos.

Outra forma de controle das enfermidades é a escolha de animais resistentes. Até o momento, acredita-se que o grupo genético dos bovinos *Bos indicus* seria mais tolerante às infecções, ao passo que animais *Bos taurus* seriam mais suscetíveis. Para o esclarecimento de questões como esta tornam-se importantes os trabalhos que determinem a prevalência, os fatores associados às infecções e as possíveis alterações clínicas e hematológicas causadas pelos agentes.

Os animais da raça Crioula Lageana, de linhagem genética *Bos taurus*, são considerados altamente resistentes e adaptados às condições de vida no Planalto Serrano Catarinense. A rusticidade é uma das qualidades mais evidentes da raça, gerando animais produtivos mesmo em meio às condições adversas de criação. Apesar de sua importância, a raça ainda é pouco explorada em estudos científicos e carece de informações acerca da sanidade dos rebanhos.

Trabalhos que venham a avaliar a prevalência de enfermidades nestes rebanhos são necessários, da mesma forma que estudos que avaliem a resposta dos exemplares desta raça nativa frente às doenças. O conhecimento do comportamento da raça Crioula Lageana frente à infecção por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* é o passo fundamental para entender a manifestação destas infecções nesta raça e assim verificar possível resistência ou susceptibilidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da raça Crioula Lageana e correlacionar com as variáveis clínicas e hematológicas, e com os fatores associados às infecções.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar a prevalência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em bovinos da raça Crioula Lageana.

Identificar por meio da aplicação de questionário epidemiológico, os fatores associados à infecção por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* em bovinos da raça Crioula Lageana.

Detectar a presença dos hemoparasitos por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e relacionar com os dados do exame físico, hemograma, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático dos animais amostrados.

3 HIPÓTESES

Acredita-se que bovinos da raça Crioula Lageana apresentem alta prevalência dos agentes parasitários, no entanto, sem o desenvolvimento clínico das enfermidades.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 ANAPLASMOSE

4.1.1 Etiologia

A primeira descrição do agente causador da anaplasmosse bovina deu-se em 1910, por Sir Arnold Theiler. Ao estudar o microrganismo *Piroplasma bigeminum*, o pesquisador visualizou formas microscópicas na margem dos eritrócitos de novilhas e as denominou “pontos marginais”, cujo número aumentava no decorrer dos dias, e que foram relacionados à presença de sinais clínicos específicos nos animais. A este organismo intraeritrocítario chamou de *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910), devido à ausência de citoplasma, que foi considerado adaptado às condições de vida intracelular (THEILER, 1911).

Os sinais clínicos reportados por Sir Theiler, no entanto, preocupavam desde antes do descobrimento de seu agente causador, e foram objeto das observações de Smith e Kilborne que identificaram granulações nos eritrócitos de bovinos doentes nos Estados Unidos. Nesse momento, a doença designada como Febre do Texas, determinava perdas econômicas e era associada à presença de carapatos nos animais, os quais funcionavam como vetores (SMITH; KILBORNE, 1893).

Com os recentes avanços das tecnologias de biologia molecular, e o conhecimento acerca de genes que codificam proteínas de superfície, tornou-se possível determinar pequenas variações genéticas entre diferentes espécies do gênero *Anaplasma* sp. reclassificando-o dentro da ordem *Rickettsiales* e da família *Anaplasmataceae*, bem como do gênero *Anaplasma* (DUMLER et al., 2001).

4.1.2 Epidemiologia

A anaplasmosse possui grande importância econômica e está amplamente distribuída em todo o mundo (KOCAN et al., 2010). No Brasil e mais especificamente na região Sul, estudos têm demonstrado alta prevalência de anticorpos contra *A. marginale* em animais de todas as idades. Em Londrina, 92,9% dos 708 bovinos Holandeses avaliados apresentaram sorologia positiva para o agente (ANDRADE et al., 2001). Na região Centro-Sul do Paraná, a

soroprevalência para o agente causador da anaplasmosose em bovinos foi de 58,74% pelo teste de ELISA (MARANA et al., 2009), e para a região Noroeste do mesmo estado, a prevalência foi de 76,10% em bovinos da raça Nelore (YOSHIHARA et al., 2003). No Sudoeste do Paraná o teste sorológico revelou 24,40% de animais infectados do total de bovinos de raças leiteiras analisadas (SOTT et al., 2016). No município de Ponte Alta em Santa Catarina, um surto afetando 33 animais, avaliados por meio da técnica de Multiplex-PCR, apresentou 18 positivos para *A. marginale* (CANEVER et al. 2014). No Planalto Serrano de Santa Catarina, Vieira (2014) constatou 27,24% de amostras positivas para *A. marginale* por meio de Multiplex-PCR e assim, devido à baixa prevalência encontrada, classificou a região como sendo de instabilidade enzoótica para a enfermidade, sendo este um fator que predispõe sua ocorrência na forma de surtos.

4.1.3 Patogenia e Sinais Clínicos

Os sinais clínicos da anaplasmosose sofrem variações de acordo com as formas de apresentação da doença, que variam em intensidade e duração. A idade dos animais tende a determinar a severidade da doença, sendo que aqueles até um ano de idade apresentam sinais mais leves em comparação com animais mais velhos. É a partir dos três anos que a enfermidade tem sua maior taxa de mortalidade, com sinais clínicos mais severos (RISTIC, 1977).

A anaplasmosose aguda apresenta sinais clínicos de fraqueza, anemia, febre, constipação, icterícia, inapetência, desidratação e abortamentos. A forma superaguda da enfermidade apresenta sinais clínicos mais severos e pode gerar sinais neurológicos, sendo geralmente fatal (RISTIC, 1977).

Uma vez infectado, o animal passa por um período de incubação de sete a 60 dias (KOCAN et al., 2003). O agente invade os eritrócitos e assim ocorre a replicação, sendo que durante a infecção inicial, o número de eritrócitos infectados dobra a cada 24 horas. A partir do momento da infecção e independentemente da idade do animal, esse passará a ser portador do agente para toda a vida, desenvolvendo ou não a doença clínica, o que será determinado pela resposta imune (AUBRY; GEALE, 2011).

Bovinos persistentemente infectados mantêm baixos níveis de parasitemia, mas servem como fonte de infecção para os vetores biológicos, que passam a transmitir o agente para outros animais e reinfectam os portadores (GUGLIELMONE, 1995). As pequenas variações antigênicas que ocorrem a cada ciclo de replicação de *A. marginale* fazem com que consiga manter-se no hospedeiro ao evadir-se do sistema imune (KIESER; ERICKS; PALMER, 1990).

4.1.4 Vetores e Transmissão

A transmissão biológica de *A. marginale* é dada por aproximadamente 20 espécies de carapatos (KOCAN et al., 2004), sendo os gêneros *Boophilus* e *Dermacentor* os mais importantes. O hemoparasito pode ser transmitido ao carapato através da transmissão transestacial (entre estágios) e intraestacial (dentro do mesmo estágio), sendo que para esta última os carapatos machos são relevantes em função de sua mobilidade entre hospedeiros. Para *Boophilus* e *Dermacentor* a transmissão transovariana de *A. marginale* não foi confirmada (KESSLER, 2001).

A transmissão transplacentária no hospedeiro vertebrado, por meio de vacas cronicamente infectadas para a sua progênie também é importante via de transmissão de *A. marginale* (GRAU et al., 2013).

4.1.5 Diagnóstico

Para o diagnóstico da anaplasmosose bovina, os dados referentes à epidemiologia, os sinais clínicos e achados de necropsia podem ser válidos, no entanto, a confirmação do diagnóstico deve ser realizada por meio de exames laboratoriais. Esfregaços sanguíneos corados podem demonstrar a presença do agente no interior dos eritrócitos na microscopia óptica. Testes sorológicos e moleculares são também muito utilizados, sendo que apenas esses últimos conseguem detectar animais subclínicos (KOCAN et al., 2010).

O teste de ELISA competitivo desenvolvido por Knowles et al. (1996), demonstrou alta especificidade para a detecção de anticorpos contra a proteína de superfície MSP5 de *A. marginale*, e possibilita a verificação do contato com o agente em animais subclínicos por até seis anos após a infecção. Esta proteína, entretanto, leva a reações cruzadas entre diferentes espécies de *Anaplasma*, dificultando o diagnóstico exato em regiões onde mais de uma espécie do agente parasita os bovinos (DE LA FUENTE et al., 2005).

Testes moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas variantes vêm sendo amplamente utilizadas para o diagnóstico de animais subclínicos e demonstram alta sensibilidade. A PCR baseada no uso do gene MSP5 de *A. marginale* exibe alta sensibilidade e especificidade, sendo este gene utilizado com sucesso na amplificação de produtos de *A. marginale*, seja na PCR convencional ou real-time PCR (BACANELLI et al., 2014).

4.1.6 Alterações Hematológicas na Anaplasmosse

O hemoparasito *A. marginale* é capaz de causar anemia devido à hemólise extravascular e levar à diminuição severa do hematócrito na sua fase aguda além de grande redução no número de eritrócitos e redução na concentração de hemoglobina (ALLEN e KUTTLER, 1981).

O aumento do número de linfócitos determina o aumento da contagem de leucócitos totais nos animais parasitados. A concentração da proteína total plasmática também pode estar elevada devido ao aumento da concentração das imunoglobulinas ou reduzida em função de distúrbios hepáticos que podem estar presentes na doença clínica (COELHO, 2007).

O prognóstico para animais que apresentam alta contagem de reticulócitos é favorável, indicando resposta regenerativa da medula. (ALLEN; KUTTLER; AMERAULT, 1981).

4.2 BABESIOSE

4.2.1 Etiologia

4.2.1.1 *Babesia bovis*

Em 1888, na România, Victor Babes estudava surtos de hemoglobinúria febril ainda desconhecida e causadora de outros sinais clínicos que diferiam de algumas das principais enfermidades de bovinos conhecidas de sua época. Em sua investigação, uma bactéria redonda, brilhante e dividida em duas partes foi encontrada (BABES, 1888).

Os organismos encontravam-se aderidos aos eritrócitos ou em seu interior e espalhavam-se pelos vasos sanguíneos, incluindo os capilares de vários órgãos e músculos (BABES, 1888). Foi a primeira descrição do microrganismo que posteriormente seria conhecido como *Babesia bovis* (STARCOVICI, 1893). Em 1893, Smith e Kilborne determinaram que a transmissão destes hemoparasitos ocorria por meio de vetores, como carapatos (SMITH; KILBORNE, 1893).

Os avanços tecnológicos no campo da genética permitiram estudos do genoma de *B. bovis*, sendo importantes fontes de conhecimento deste parasito do filo Apicomplexa. Informações como essas são determinantes na formulação de vacinas e drogas para o tratamento da babesiose (BRAYTON et al., 2007), além de permitirem grandes avanços para o diagnóstico do agente (MOSQUEDA et al., 2012).

4.2.1.2 *Babesia Bigemina*

No fim do século XIX, no ano de 1893, Smith e Kilborne estudavam uma enfermidade com sinais clínicos semelhantes aos da hemoglobinúria enzoótica bovina nos Estados Unidos, a qual era conhecida por Febre do Texas. Quando conseguiram observar o microrganismo microscópico que estaria associado à enfermidade, o denominaram *Piroplasma bigeminum* e o caracterizaram como um protozoário (SMITH; KILBORNE, 1893).

Starcovici (1893) avaliou os trabalhos de Smith e Kilborne e de Babes e encontrou similaridades entre os agentes descobertos, propondo assim um novo gênero o qual denominou de *Babesia* spp.

4.2.2 Epidemiologia

A babesiose é mundialmente distribuída e ocorre com maior frequência em regiões de clima temperado e tropical (GIGLIOTTI et al., 2016). No Brasil, o primeiro relato da doença deu-se em 1901 no Rio de Janeiro, trazida por meio de animais importados (FONSECA; BRAGA, 1924). Nos últimos anos, estudos em diferentes regiões visam a determinação da prevalência dos agentes causadores da enfermidade nos rebanhos (SOUZA et al., 2002).

No Sul do Brasil, mais especificamente no Sudoeste do Paraná, Elias et al. (2016) encontraram alta prevalência de *B. bovis* e *B. bigemina* nos animais amostrados, chegando a 95,5% e 96,6% respectivamente de animais positivos no teste sorológico de ELISA. Osaki et al. (2002) no município de Umuarama, Noroeste paranaense, obtiveram 64,2% dos animais analisados soropositivos para *B. bovis* pelo mesmo teste.

No Planalto Norte de Santa Catarina, o rebanho apresentou taxa de 76,8% de positividade para *B. bovis* e 84,5% para *B. bigemina* pelo teste de Imunofluorescência Indireta (SOUZA et al., 2002). Mais recentemente, utilizando-se a técnica de Multiplex-PCR verificou-se em surto de babesiose e anaplasmosse ocorrido em Ponte Alta em Santa Catarina, 18,2% dos animais atendidos confirmados como positivos para a presença de *B. bovis* e 63,6% para *B. bigemina* (CANEVER et al., 2014). Outro estudo avaliou a prevalência dos agentes do Complexo Tristeza Parasitária e verificou que 29,57% do rebanho bovino do Planalto Catarinense é positivo para *B. bovis* e 16,73% para *B. bigemina* pela mesma técnica de Multiplex-PCR, sendo que estes índices representaram situação de instabilidade enzoótica para a babesiose nos rebanhos da região, fazendo-se necessário o controle dos vetores (VIEIRA, 2014).

4.2.3 Patogenia e Sinais Clínicos

Nas infecções por *B. bovis*, a produção excessiva de mediadores inflamatórios e o efeito direto da destruição dos eritrócitos pelos parasitos podem estar diretamente ligados à patogenia da enfermidade. A presença do parasito no sangue, durante a infecção aguda, ativa os macrófagos que produzem citocinas pró-inflamatórias e moléculas parasiticidas (BROWN; PALMER, 1999). A quantidade produzida destas moléculas pode contribuir para a ocorrência de vasodilatação, hipotensão, aumento da permeabilidade capilar, edema, colapso vascular, desordens na coagulação, dano endotelial e estase circulatória (WRIGHT et al., 1989; AHMED 2002). Na microcirculação, a estase é também induzida pela agregação de eritrócitos infectados nos capilares, levando à lesões mais graves no cérebro e pulmões (BROWN e PALMER, 1999). Nas infecções por *B. bigemina*, a patogenia está quase totalmente relacionada à hemólise intravascular (BOCK et al., 2004).

Os sinais clínicos da babesiose variam de leves a severos, sendo que muitos animais podem permanecer assintomáticos (DANTAS-TORRES et al., 2017). Animais jovens tendem a ser mais resistentes quando oriundos de rebanhos que possuem contato constante com o agente, o que está relacionado à imunidade inata, a função protetora da hemoglobina fetal e à atividade eritropoietica da medula óssea (BOCK et al., 2004). Animais que não possuem imunidade e são movidos para áreas endêmicas podem sofrer a forma hiperaguda da doença e assim podem vir a óbito (DANTAS-TORRES et al., 2017).

O parasitismo eritrocítico com destruição das células parasitadas leva à sinais clínicos como anemia e hemoglobinúria, podendo ainda ocorrer insuficiência renal e síndrome de angústia respiratória (HUNFELD et al., 2008). Outros sinais que podem ocorrer são diarreia, anorexia, perda de peso e letargia (DANTAS-TORRES et al., 2017).

O sequestro de eritrócitos pelos capilares cerebrais leva à babesiose cerebral, o que é comumente encontrado em casos de babesiose por *B. bovis*. A babesiose cerebral caracteriza-se por quadros de incoordenação, convulsões, movimentos de pedalagem, paralisia de membros pélvicos e coma (DANTAS-TORRES et al., 2017).

4.2.4 Vetores e Transmissão

O desenvolvimento da babesiose envolve hospedeiros vertebrados suscetíveis e carrapatos infectados. As diferentes espécies de *Babesia* spp. possuem diferentes espécies de carrapatos como vetores (MEHLHORN; SCHEIN, 1984). A principal espécie envolvida na transmissão de *B. bovis* e *B. bigemina* é a do carrapato *Rhipicephalus microplus* (BOCK et al., 2004), sendo que as fêmeas adultas adquirem a infecção pelos hemoparasitos quando se alimentam de bovinos infectados, mesmo que com baixa parasitemia (HOWELL et al., 2007).

As fêmeas adultas são capazes de transmitir os agentes da babesiose para sua prole através da transmissão transovariana, uma vez que após a reprodução assexuada no intestino dos carrapatos, os hemoparasitos migram para diferentes tecidos do vetor, inclusive ovários das fêmeas destes ixodídeos (MEHLHORN; SCHEIN, 1984).

Entre os tecidos que são atingidos pelas espécies de *Babesia* estão as glândulas salivares do hospedeiro invertebrado, o que é decisivo na transmissão dos agentes para os hospedeiros vertebrados durante a alimentação dos carrapatos (MEHLHORN; SCHEIN, 1984).

Formas infectantes do protozoário estão presentes na glândula salivar dos vetores e dessa forma são depositados na derme do hospedeiro vertebrado. Uma vez alcançada a circulação sanguínea, o hemoparasito invade os eritrócitos e os rompe durante sua multiplicação, conseguindo assim invadir novos eritrócitos (MEHLHORN; SCHEIN, 1984).

Durante o repasto sanguíneo os carrapatos reinfectam-se e dessa forma o hemoparasito é capaz de se multiplicar nos mais diversos tecidos do hospedeiro invertebrado, incluindo ovários, ovos e também as glândulas salivares. Dessa forma, ao alimentar-se, o carrapato reinicia o ciclo de transmissão (MEHLHORN; SCHEIN, 1984).

4.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico da babesiose é uma importante ferramenta para o estabelecimento de estratégias de controle da disseminação da enfermidade. Os métodos mais utilizados são a detecção microscópica, os métodos imunológicos e as técnicas moleculares (MOSQUEDA et al., 2012).

Os esfregaços sanguíneos em camada delgada são o método mais antigo para a detecção dos agentes da babesiose por meio de sua observação microscópica. Apesar da facilidade de aplicação do método, este é eficiente apenas em casos agudos, quando a parasitemia encontra-se elevada, de modo que animais portadores assintomáticos em geral não são reconhecidos por esta técnica. No caso de infecção por *B. bovis*, esfregaços cerebrais também podem ser uma ferramenta diagnóstica útil (MOSQUEDA et al., 2012).

Métodos imunológicos, como ELISA e Imunofluorescência Indireta são utilizados de forma a detectar animais portadores, aqueles cujo nível de parasitas no sangue é muito baixo, buscando por anticorpos contra esses agentes (MOSQUEDA et al., 2012). No entanto, estes testes não diferenciam a infecção corrente da primo-exposição. Além disso, há possibilidade de reações cruzadas entre *B. bovis* e *B. bigemina* (BRITO et al., 2013).

Atualmente, técnicas moleculares, como a PCR, têm se mostrado altamente sensíveis e específicas (BRITO et al., 2013). A Nested-PCR, uma adaptação da técnica de PCR, é capaz de incrementar a sensibilidade do teste, aumentando o nível de detecção dos hemoparasitos em animais subclínicos (BRITO et al., 2013), sendo largamente utilizada (ABOULAILA et al., 2010).

4.2.6 Alterações Hematológicas na Babesiose

Exames laboratoriais podem ser auxiliares no diagnóstico da babesiose. Animais infectados por *Babesia* spp. apresentam anemia regenerativa, reticulocitose, contagem aumentada de leucócitos e concentração de proteína total sérica aumentada (DANTAS-TORRES et al., 2017).

Zulfiqar et al. (2012) demonstraram redução da concentração de hemoglobina em bovinos infectados por *B. bovis*, enquanto para *B. bigemina*, Saleh (2009), observou redução da contagem de eritrócitos, da concentração de hemoglobina e do hematócrito em animais naturalmente infectados quando comparados com animais controle.

4.3 A RAÇA CRIOLA LAGEANA

A introdução de bovinos no estado de Santa Catarina deu-se com a vinda dos jesuítas para o Rio Grande do Sul e com a invasão das missões pelos bandeirantes (ARAÚJO, 1990). Muitos animais extraviram-se no caminho e formaram rebanhos nos Campos de Lages. Mais tarde, com a colonização do Planalto Catarinense houve a introdução de novos bovinos, que cruzaram com aqueles que ali estavam, originando assim, a raça Criola Lageana (MARIANTE; CAVALCANTE, 2000).

Os animais que se espalharam pela Serra Catarinense por quase cinco séculos sofreram miscigenação e seleção natural, mesmo em meio às condições pouco favoráveis do Planalto Catarinense, com seus invernos rigorosos e pouco alimento à disposição, resultando em uma

raça naturalizada com excelente adaptação às condições ambientais da região (MARIANTE e CAVALCANTE, 2000). No entanto, com a vinda de materiais genéticos de bovinos europeus para a região pelo seu apelo estético e produtivo o gado Crioulo sofreu grande miscigenação e quase foi levado à extinção (MARTINS et al., 2009).

Graças ao trabalho de resgate e preservação de alguns animais ainda existentes na região de Lages-SC, tem-se o grupo racial conhecido hoje como Crioulo Lageano (CAMARGO e MARTINS, 2005). Ainda são poucos os estudos realizados com raças naturalizadas no Brasil, incluindo-se aí o Crioulo Lageano (EGITO et al., 2007, SPRITZE et al., 2003, SERRANO et al., 2004, BIANCHINI et al., 2006, TEIXEIRA et al., 2012, FINO et al., 2013, CARDOSO et al., 2013).

Alguns levantamentos epidemiológicos foram realizados com relação a certas enfermidades causadoras de prejuízos à raça Crioula Lageana e as informações obtidas com estes estudos são a base para a determinação de dados sobre a sanidade animal, além de serem o fundamento para a elaboração de planos de controle e profilaxia (FINO et al., 2013).

É importante destacar que programas de melhoramento genético e conservação de recursos genéticos animais estão ancorados nas pesquisas das raças naturalizadas, de modo que a preservação do patrimônio genético do Crioulo Lageano é imprescindível para o Planalto Catarinense (EGITO et al., 2002, SERRANO et al., 2004, MARTINS et al., 2009).

4.4 EFEITO DA RAÇA SOBRE A RESPOSTA ÀS INFECÇÕES POR *BABESIA* spp. E *ANAPLASMA MARGINALE*

É bem estabelecida a existência de relação entre a resistência aos carrapatos e as raças bovinas, no entanto, as informações relativas à resistência genética à babesiose ainda são escassas, ainda que algumas variações entre raças tenham sido reportadas (BOCK et al., 1997, 1999; AGUIRRE et al., 1990).

Ainda não se conhecem os genes envolvidos na expressão da resistência às babesioses, mas sabe-se que é uma característica hereditária (BILHASSI et al., 2014) e que animais *Bos taurus indicus* são mais resistentes às babesias e ao seu vetor do que animais *Bos taurus taurus* (JONSSON et al., 2008; PIPER et al., 2010).

Uma vez que as raças apresentem variações relacionadas à resistência à infecção por babesias, torna-se importante ferramenta de prevenção e controle da enfermidade a identificação e a seleção dos animais resistentes. No caso da babesiose bovina, os métodos diagnósticos específicos e sensíveis, especialmente para os animais portadores, têm

proporcionado conhecimento de vários aspectos da relação hospedeiro-parasita, como a existência de raças indiferentes à infecção (BILHASSI et al., 2014).

Para *Anaplasma marginale*, Bock et al (1997), verificaram que animais *Bos taurus* puros são mais suscetíveis à doença clínica quando comparados à animais oriundos de cruzas de *B. taurus* com *B. indicus* e animais puros *B. indicus*.

Benavides e Sacco (2007) demonstraram haver variação na resposta à infecção por *B. bovis* em *Bos taurus*, sendo que os bovinos resistentes apresentaram menor parasitemia e menor redução do hematócrito. Cardoso et al. (2014) concluíram em estudo comparativo entre as raças Aberdeen Angus e Crioula Lageana, que esta última apresenta maior resistência à infestação por bernes e carrapatos.

Estas afirmações reforçam a importância do conhecimento da epidemiologia da babesiose e anaplasmosse dentro de populações de raças específicas de forma a fornecer subsídios para estudos mais aprofundados de tolerância às enfermidades.

REFERÊNCIAS

- ABOULAILA, M.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Development and evaluation of a nested PCR based on spherical body protein 2 gene for the diagnosis of *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 169, n. 1, p. 45-50, 2010.
- AGUIRRE, D.H. et al. Infección natural con *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en bovinos de raza Hereford, Criolla y Nelore en Tucumán, Argentina. **Revista de Medicina Veterinaria**, v.71, p. 54-60, 1990.
- AHMED, J. The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmoses. **Parasitology Research**, v. 88, p. S48-S50, 2002.
- ALLEN, P.C.; KUTTLER, K.L.; AMERAULT, T.E. Clinical chemistry of anaplasmosis: blood chemical changes in infected mature cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 2, p. 322-325, 1981.
- ANDRADE, G.M. et al. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in dairy cattle and, studies on the dynamics of natural infection of Holstein calves in Southern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 155-159, 2001.
- ARAUJO, R.V. **Os jesuítas dos 7 povos**. Porto Alegre: La Salle, 1990. 467p.
- AUBRY, P.; GEALE, D.W. A review of bovine anaplasmosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, n. 1, p. 1-30, 2011.
- BABES, V. Sur l'hemoglobinurie bacterienne du boeuf. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie de Sciences**, v. 107, p. 692-694, 1888.
- BACANELLI, G.M.; RAMOS, C.A.N.; ARAUJO, F.R. Molecular diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle: quantitative evaluation of a real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) based on msp5 gene. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 29-33, 2014.
- BENAVIDES, M.V.; SACCO, A.M.S. Differential *Bos taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 150, n. 1, p. 54-64, 2007.

BIANCHINI, E. et al. Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.9, p.1443-1448, 2006.

BILHASSI, T.B. et al. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 234-238, 2014.

BOCK, R.E. et al. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 5, p. 337-340, 1997.

BOCK, R.E.; KINGSTON, T.G.; VOS, A.J. de. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 7, p. 461-464, 1999.

BOCK, R. et al. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S247-S269, 2004.

BRAYTON, K.A. et al. Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotezoa. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 10, p. e148, 2007.

BRITO, L.G. et al. *Babesia bovis* infection in cattle in the southwestern Brazilian Amazon. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 4, n. 1, p. 78-82, 2013.

BROWN, W.C.; PALMER, G.H. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Parasitology Today**, v.15, p.275-281, 1999.

CAMARGO, M.A.R.; MARTINS, V.M.V. Raça bovina Crioula Lageana, um patrimônio genético. **A Hora Veterinária**, v. 24, n. 143, p. 61-64, 2005.

CANEVER, M.F. et al. First evaluation of an outbreak of bovine babesiosis and anaplasmosis in Southern Brazil using multiplex PCR. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 52, n. 5, p. 507, 2014.

CARDOSO, C.P. et al. Resistance against gastrointestinal nematodes in Crioulo Lageano and crossbred Angus cattle in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.192, n.1-3, p.183-191, 2013.

CARDOSO, C.P. et al. Resistance against ectoparasites in Crioulo Lageano and crossbred Angus cattle in southern Brazil under natural conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 141-146, 2014.

COELHO, L.C.T. **Anaplasmosis bovina: parâmetros clínicos e de patologia clínica em bezerros infectados experimentalmente**. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2007.

DANTAS-TORRES, F. et al. Babesiosis. In MARCONDES, C.B. **Arthropod Borne Diseases**. Switzerland: Springer International Publishing, 2017. p. 347-354.

DE LA FUENTE, J. et al. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 01, p. 75-89, 2005.

DUMLER, J.S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**, v.51, p.39-52, 2002.

EGITO, A.A. et al. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. **BMC Genetics**, v.8, n.83, p.1-14, 2007.

ELIAS, F. et al. Levantamento sorológico dos agentes da tristeza parasitária em bovinos de leite na região Sudoeste do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 102-103, 2016.

FINO, T.C.M. et al. Occurrence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in Crioula Lageana cattle. **Journal of Animal Sciences Advances**, v.3, n.4, p.165-170. 2013.

FONSECA, A., BRAGA, A. **Noções sobre a tristeza parasitária dos bovinos**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1924, 216p.

GIGLIOTTI, R. et al. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 657-662, 2016.

GRAU, H.E.G. et al. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 189-193, 2013.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 109-119, 1995.

HOWELL, J. M. et al. Transovarial transmission efficiency of *Babesia bovis* tick stages acquired by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* during acute infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 426-431, 2007.

HUNFELD, K.P.; HILDEBRANDT, A.; GRAY, J.S. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1219-1237, 2008.

JONSSON, N.N.; BOCK, R.E.; JORGENSEN, W.K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1, p. 1-9, 2008.

KESSLER, R.H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.

KIESER, S.T.; ERIKS, I.S.; PALMER, G.H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 4, p. 1117-1119, 1990.

KNOWLES, D. et al. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, 1996.

KOCAN, K.M. et al. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.

KOCAN, K.M. et al. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S285-S300, 2004.

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

MARANA, E.R.M. et al. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná, Brasil, por um teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 20-26, 2009.

MARIANTE, A.S.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2000. 232p.

MARTINS, V.M.V. et al. **Raça Crioula Lageana: O esteio de ontem, o labor de hoje e a oportunidade do amanhã**. Lages: ABCCL. 2009. 80p.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v. 23, p. 37-103, 1984.

MOSQUEDA, J. et al. Current advances in detection and treatment of babesiosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 1504-1518, 2012.

OSAKI, S.C. et al. Ocorrência de anticorpos anti *Babesia bovis* e estudo sobre a infecção natural em bovinos da raça nelore, na região de Umuarama, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 2, p. 77-83, 2002.

PIPER, E.K. et al. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 4, p. 431-441, 2010.

RISTIC, M. Bovine anaplasmosis. In: KREIER, J. (ed.), **Parasitic Protozoa**, vol. 4. New York: Academic Press, 1977. p. 235-249.

SALEH, M.A. Erythrocytic oxidative damage in crossbred cattle naturally infected with *Babesia bigemina*. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 1, p. 43-48, 2009.

SERRANO, G.M. et al. Genetic diversity and population structure of Brazilian native bovine breeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.6, p.543-549, 2004.

SMITH, T.; KILBORNE, F.L. **Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever.** US Government Printing Office, 1893.

SOTT, T. et al. Enzootic instability for bovine anaplasmosis on family farms located in southwestern Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 497-500, 2016.

SPRITZE, A. et al. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.10, p.1157-1164, 2003.

SOUZA, A.P. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Babesia* em bovinos no Planalto Norte de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 1, n. 1, p. 21-23, 2002.

STARCOVICI, C. Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krankheiten, die seuchenhafte Hämoglobinurie des Rindes (Babes), das Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). **Centralblatt Bakterio**, v. 14, p. 1-8, 1893.

TEIXEIRA, W.T et al. Transfer of passive immunity and serum proteinogram in the first six months of life of Criollo Lageano and black and white holstein calves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.980-986, 2012.

THEILER, A. *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.): the marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. In: **Report of the Government Veterinary Bacteriologists**. Pretoria: Government Printing and Stationery Office, p. 7-64, 1910.

THEILER, A. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. In: **1st Report of the Director of Veterinary Research, Department of Agriculture of the Union of South Africa**. Pretoria: Government Printer and Stationery Office, 1911. p. 7-32.

VIEIRA, L. L. **Prevalência e dinâmica de infecções por Anaplasma marginale, Babesia bovis e Babesia bigemina em bovinos na região serrana de Santa Catarina.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina, 2014. 83p.

WRIGHT, I.G. et al. Immunopathophysiology of babesial infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 11-13, 1989.

YOSHIHARA, E. et al. Studies of natural infection with *Anaplasma marginale* in Nelore cattle in the Umuarama municipality, Paraná State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 21-26, 2003.

ZULFIQAR, S. et al. Detection of *Babesia bovis* in blood samples and its effect on the hematological and serum biochemical profile in large ruminants from Southern Punjab. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 104-108, 2012.

5 PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR ANAPLASMA MARGINALE EM BOVINOS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA

Resumo

A anaplasmosse bovina é causadora de grandes prejuízos para a pecuária em função das altas taxas de morbidade e mortalidade. Nas raças nativas, como a raça Crioula Lageana, são escassos os estudos sobre a epidemiologia desta enfermidade. Este trabalho visa a obtenção de dados iniciais sobre a prevalência de *A. marginale* em bovinos da raça Crioula Lageana, visando novos estudos acerca da sanidade e tolerância à doenças nesta população. Foram colhidas amostras de sangue de 311 bovinos da raça Crioula Lageana, sendo submetidas à extração de DNA e à PCR com primers específicos para a detecção do agente da anaplasmosse bovina. Os animais foram divididos de acordo com o sexo, categoria (touros, vacas, novilhas e bezerros) e a presença ou ausência de carapatos no momento da colheita. Para a determinação de possíveis fatores associados à infecção aplicou-se questionário epidemiológico aos proprietários. Obteve-se prevalência de infecção de 79,91%; (248/311) por *A. marginale* nos bovinos da raça Crioula Lageana. Não foram observadas diferenças significativas para a presença do hemoparasito de acordo com a categoria, o sexo e a presença de carapatos nos animais. Os fatores associados à infecção que apresentaram diferenças significativas, foram a finalidade produtiva da criação, a regularidade no controle de carapatos, os acaricidas usados, e a categoria mais infestada por carapatos. Conclui-se que os bovinos da raça Crioula Lageana encontram-se em situação de estabilidade enzoótica, com alta prevalência para a infecção por *A. marginale* pela técnica de PCR. Verificou-se não haver influência do sexo, da categoria e da infestação por carapatos nas taxas de infecção. Os principais fatores associados à presença ou ausência de infecção foram a finalidade produtiva da criação, a regularidade no controle de carapatos, os acaricidas usados e a categoria mais infestada por carapatos.

Palavras-chave: Raça nativa. Sanidade. Anaplasmosse.

5.1 INTRODUÇÃO

A anaplasmosse, causada pelo agente *Anaplasma marginale*, é uma enfermidade amplamente distribuída (KOCAN et al., 2010), causadora de enormes prejuízos econômicos decorrentes da alta morbidade e mortalidade e dos custos com controle da enfermidade (BROWN, 1997). A transmissão do hemoparasito depende de vetores, como o carrapato *Rhipicephalus microplus*, o qual se desenvolve em regiões de clima tropical e subtropical (GUGLIELMONE et al., 1995). No estado de Santa Catarina, no Sul do Brasil, onde a raça Crioula Lageana teve seu desenvolvimento, danos ocasionados por carrapatos, principalmente relacionados à transmissão de patógenos, são frequentes (PAIM et al., 2011).

A epidemiologia da anaplasmosse varia de acordo com a região de estudo (SHARMA et al., 2015), e com fatores relacionados à características raciais, as quais podem predispor ou não o desenvolvimento de doença clínica (BOCK; KINGSTON; DE VOS, 1999). Animais da raça Crioula Lageana possuem rusticidade e adaptabilidade reconhecidas, no entanto essa raça foi quase levada à extinção, sendo que hoje existem núcleos de conservação para manutenção da raça (MARTINS et al., 2009).

O conhecimento do comportamento da infecção por *A. marginale* nos bovinos da raça Crioula Lageana tem sua importância como um passo para o conhecimento do status sanitário desses rebanhos e para que se invista na exploração do potencial genético da raça em programas de melhoramento genético, tendo em vista suas excelentes características produtivas.

Dados referentes à sanidade animal, são fundamentais para atender às exigências de comercialização de produtos animais dentro e fora do Brasil (JULIANO et al., 2014). Sendo assim, levantamentos epidemiológicos baseados em técnicas moleculares fornecem dados mais precisos e confiáveis do que os obtidos por meio da sorologia (BRITO et al., 2010). Em recentes levantamentos, o Planalto Catarinense é apontado como região de instabilidade enzoótica para a anaplasmosse, o que favorece a ocorrência da enfermidade na forma de surtos (VIEIRA, 2014; CANEVER et al. 2014). O conhecimento acerca dos fatores de risco associados à infecção também são importantes fontes de dados para o desenvolvimento de estratégias ou metodologias de prevenção e controle de doenças nas populações.

Este estudo objetiva apresentar o primeiro levantamento de dados epidemiológicos da infecção por *A. marginale* em animais da raça Crioula Lageana por meio de técnicas moleculares e os fatores associados à aquisição do agente nas propriedades criadoras e conservadoras da raça no estado Santa Catarina, Brasil.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Determinação do tamanho amostral

Para a avaliação da prevalência de *A. marginale* na população de bovinos da raça Crioula Lageana, foram utilizadas as seguintes fórmulas de acordo com a OPAS (1979):

$$n_0 = \frac{1,96^2 [p(1-p)]}{(d)^2}$$

Onde n_0 é o número de amostras; p a prevalência esperada e d a margem de erro. Admitindo-se prevalência estimada de 50% de amostras positivas, um intervalo de confiança de 95% e uma margem de erro de 5%, o resultado obtido foi de 384 animais. No entanto, como trata-se de uma população finita, procedeu-se o seguinte cálculo:

$$n = \frac{N \times n_0}{N + n_0}$$

Onde N é o número total de animais na população, sendo que para a raça Crioula Lageana esse número é de 1500 animais. A partir destes cálculos, chegou-se ao número final de 306 animais a serem amostrados.

5.2.2 Animais e obtenção das amostras

Foram colhidas amostras de sangue de 311 bovinos da raça Crioula Lageana, machos e fêmeas, jovens e adultos, todos registrados na Associação Brasileira de Criadores da Raça Crioula Lageana (ABCCL), oriundos de propriedades núcleos de conservação *in situ*, localizadas no Planalto Catarinense. Os animais foram separados por categorias, tendo sido colhidas amostras de 32 touros (machos com mais de dois anos), 141 vacas (fêmeas com mais de dois anos), 66 novilhas (fêmeas entre um e dois anos) e 72 bezerros (machos e fêmeas de até um ano). A ausência de novilhos deveu-se ao fato de as amostras serem oriundas de propriedades núcleo de conservação *in situ* da raça, de modo que machos que não forem destinados à reprodução são vendidos. Para a análise com relação ao sexo, os animais foram separados em 62 machos e 249 fêmeas, sem distinção de idade. Para tal, foram utilizados tubos de coleta à vácuo com anticoagulante EDTA a 10%. Após a colheita, as amostras foram congeladas a -20°C até a extração do DNA.

5.2.3 Exame Físico

O exame físico foi empregado para a verificação de sinais clínicos compatíveis com a doença clínica, onde se aferiu a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), movimentos ruminais (MR), temperatura retal e coloração das mucosas.

5.2.4 Extração de DNA

As amostras de sangue, após seu descongelamento foram imediatamente submetidas à extração de DNA por meio de kit comercial ReliaPrepTM Blood gDNA Miniprep System (PROMEGA[®]), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, a concentração de cada amostra de DNA foi mensurada por meio de espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific[®]) e diluído para manter-se à concentração mínima de 20ng/µL.

5.2.5 Análise molecular

Para a amplificação do DNA de *A. marginale* utilizou-se o primer baseado no gene MSP5 (MSP5 F: 5'-CGC AGA TCT AGC AAA ATC GGC GAG AGG TTT ACC ACT TC-3' e MSP5 R: 5'-GCG CTG CAG TGG CGC AAA ATG CCC GAC ATA CC-3'), o qual amplifica um fragmento de 458pb para o agente.

A reação de PCR deu-se em microtubos de 0,2mL, onde adicionou-se um volume final de 25 µL de solução, contendo 1U de enzima *Taq* Polimerase GoTaq[®] Hot Start Polymerase, (Promega); 8,5 pmoles de cada primer; 0,2mM de nucleotídeos (dNTPs); 3,5mM de cloreto de magnésio; 5µL de tampão 5X Green GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega); 3µL de DNA (concentração entre 20 e 100ng/µL) e água ultra pura para completar o volume final e ajustar a concentração dos reagentes. Foram utilizados controles positivos e negativos a cada reação, sendo que este último foi utilizado para garantir a qualidade e especificidade da técnica, abordando os mesmos parâmetros citados anteriormente, substituindo apenas o uso de DNA genômico por água ultra pura, livre de DNase. As condições de temperatura aplicadas no termociclador (Biocycler) envolveram a desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54,2°C por 1 minuto e 73°C por 1 minuto, e ainda uma extensão final a 73°C por 7 minutos.

A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 2% acrescido do corante Unisafe Dye 20.000x (Uniscience). Na primeira lacuna do gel utilizou-se marcador de peso molecular de 100pb como padrão para determinar o tamanho das bandas das amostras. As condições da fonte elétrica foram de 140 Volts e 400mA por 01h00min, e visualização mediante exposição à luz ultravioleta. Bandas com tamanho próximo a 458pb foram consideradas positivas para *A. marginale*.

5.2.6 Fatores Associados

Para a determinação dos fatores associados ao desenvolvimento da anaplasmosse foi realizada a aplicação de questionário epidemiológico aos proprietários de cada propriedade analisada, contendo perguntas voltadas ao perfil da propriedade.

5.2.7 Análise Estatística

A análise univariada foi realizada para comparar as taxas de infecção por *A. marginale* com o sexo, a categoria dos animais e a presença de carrapatos nos animais no momento da colheita de amostras, utilizando o teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$) e análise da Odds Ratio. O modelo estatístico aplicado para os dados do questionário foi composto por análise univariada, por meio do teste de qui-quadrado ($p < 0,05$). Para as questões com resultado significativo nesta primeira análise, procedeu-se a análise multivariada, por meio de análise de regressão logística ($p < 0,05$), sendo que questões que apresentassem multicolinearidade nesta segunda análise foram excluídas da avaliação, de modo a possibilitar a verificação da associação entre a presença ou ausência do agente e os fatores associados.

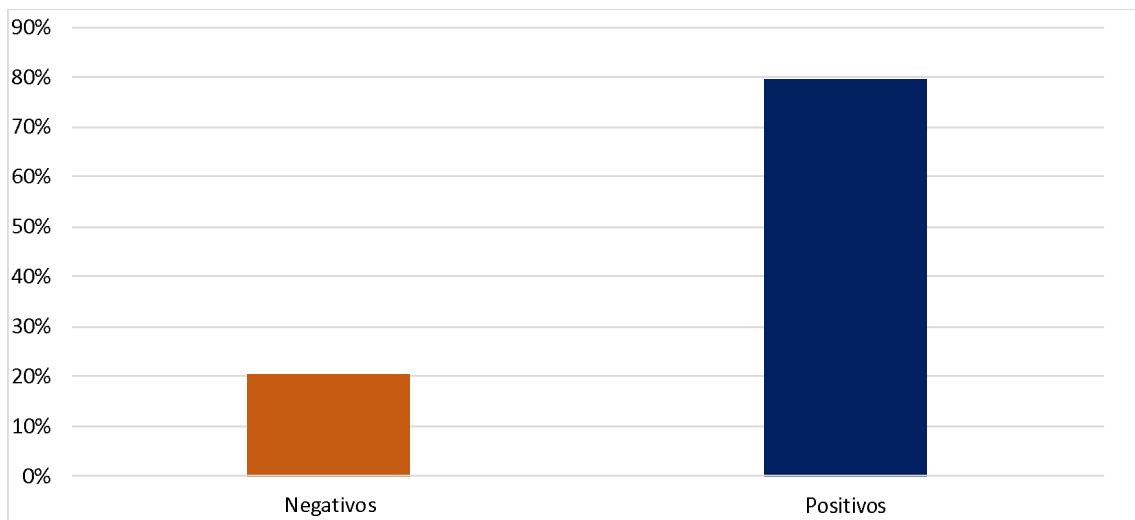
5.2.8 Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob número de protocolo 2461171115, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UDESC, pelo parecer número CAAE 2.068.771.

5.3 RESULTADOS

A prevalência obtida para a infecção por *A. marginale* foi de 79,74% (248/311) (Gráfico 1). Todos os animais positivos foram considerados subclínicos, pois nenhuma alteração nos parâmetros avaliados no exame físico foi verificada, mantendo-se todos dentro dos valores de referência para a espécie (dados não apresentados).

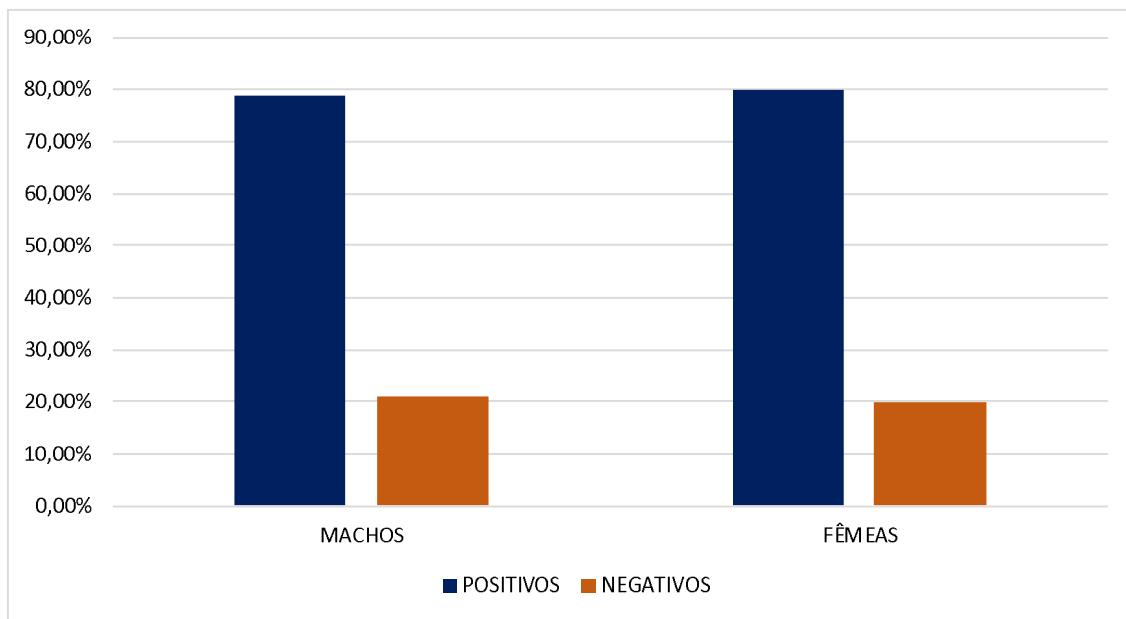
Gráfico 1 - Prevalência de *A. marginale* em 311 bovinos da raça Crioula Lageana, determinada pela técnica de PCR, no estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: elaborada pela autora, 2017.

Ao serem avaliados o sexo e a categoria dos animais em relação à presença ou ausência da infecção, obteve-se que do total de animais amostrados 249 (249/311; 80,06%) eram fêmeas e 199 (199/249; 79,91%) apresentaram-se positivas para o agente. Dos 62 (62/311; 19,94%) machos avaliados, 49 (49/62; 79,03%) apresentaram resultado positivo. Na comparação entre os sexos, não houve diferença significativa para animais parasitados ($p=0,983$) (Gráfico 2).

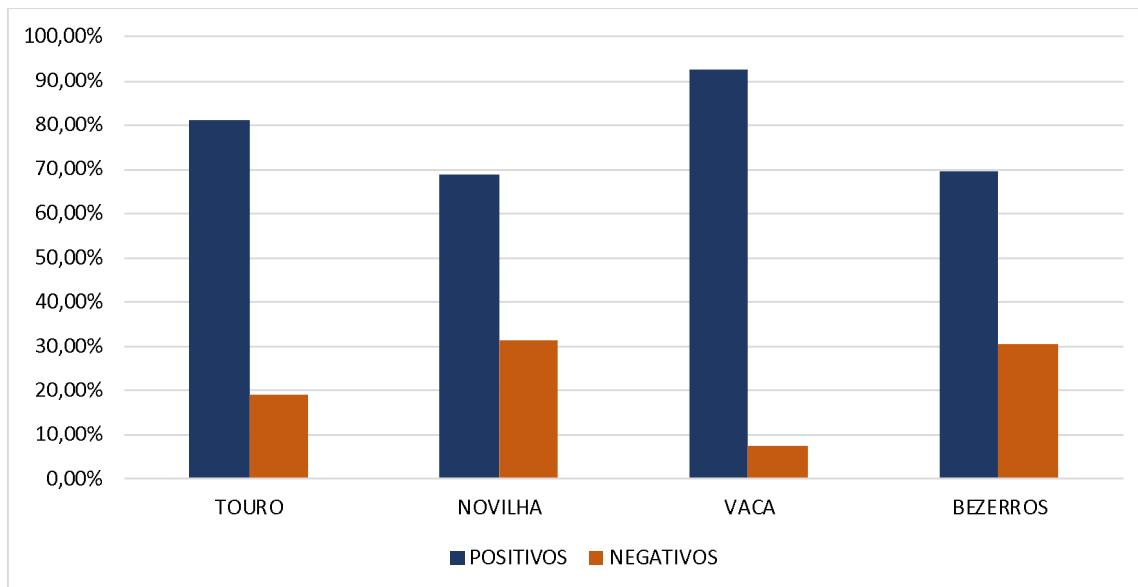
Gráfico 2– Percentual de animais parasitados por *A. marginale* detectados pela técnica de PCR, da raça Crioula Lageana de acordo com o sexo, sendo 249 fêmeas e 50 machos, no estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: elaborada pela autora, 2017.

Dos 32 (32/311; 10,29%) touros avaliados, 26 (26/32; 81,25%) apresentaram-se positivos, bem como das 66 (66/311; 21,22%) novilhas, 57 (57/66; 86,36%) foram positivas. Entre as 141 (141/311; 45,33%) vacas, 115 (115/141; 81,56%) apresentaram bandas na eletroforese compatíveis com *A. marginale*, da mesma forma que 50 (50/72; 69,44%) bezerros de um total de 72 (72/311; 23,15%). O teste de qui-quadrado não apontou diferenças significativas ($p=0,077$) nas proporções de animais positivos entre as categorias (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Percentual de bovinos parasitados por *A. marginale* pela técnica de PCR, da raça Crioula Lageana de acordo com a categoria, sendo 32 touros, 66 novilhas, 141 vacas e 72 bezerros, no estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: elaborada pela autora, 2017.

Avaliou-se também a relação entre a presença ou ausência de carrapatos parasitando os animais no momento da colheita de amostras e a positividade ou não para a infecção por *A. marginale*. Esta análise demonstrou não haver relação significativa entre as variáveis no teste de qui-quadrado ($p=0,274$).

Na análise das respostas dos questionários aplicados aos proprietários, a finalidade produtiva da criação, o contato dos bovinos com outras espécies animais, a reposição de animais, a assistência veterinária, os casos anteriores de anaplasmoses, o período de maior infestação por carrapatos, a presença de insetos hematófagos, o controle de carrapatos, os acaricidas usados e a época de tratamentos para carrapatos e babesiose, bem como as categorias mais parasitadas por carrapatos obtiveram diferença significativa na análise univariada dos fatores associados (Tabela 1):

Tabela 1 - Análise univariada dos fatores associados à infecção por *A. marginale* determinada pela técnica de PCR para bovinos da raça Crioula Lageana.

<i>Variáveis</i>	<i>Infecção por A. marginale</i>				<i>p</i>
	<i>Positivos</i>		<i>Negativos</i>		
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
Número de animais na propriedade					
De 51 a 100	42	13,5	5	1,6	
Mais de 100	206	66,2	58	18,7	0,113
Finalidade produtiva da criação					
Carne, reprodução e venda	134	43	31	10	<0,001

Carne	14	4,5	3	1	
Reprodução e venda	58	18,6	3	1	
Carne e venda	14	4,5	24	7,7	
Venda	28	9	2	0,7	
Tamanho da propriedade					
De 50 a 100 ha	14	4,5	3	1	
Maior que 100 ha	234	75,2	60	19,3	0,972
Contato dos bovinos com outras espécies animais					
Equino, cão e ovino	63	20,3	9	3	
Suíno	28	9	2	0,6	
Equino e cão	14	4,5	24	7,7	
Equino, suíno, cão e gato	58	18,6	3	1	<0,001
Equino, cão, gato, ave e ovino	71	22,8	22	7	
Equino, cão, gato e silvestres	14	4,5	3	1	
Contato com bovinos de outras propriedades					
Sim	135	43,4	36	11,6	
Não	113	36,3	27	8,7	0,807
Reposição de animais					
Próprio rebanho	91	29,3	11	3,5	
Próprio rebanho e outras propriedades	157	50,5	52	16,7	0,006
Assistência veterinária					
Sim	105	33,8	35	11,2	
Não	143	46	28	9	0,082
Casos anteriores de anaplasmosse					
Sim	77	24,8	33	10,6	
Não	171	55	30	9,6	0,003
Período de maior infestação por carrapatos					
Outono	72	23,1	6	2	
Verão	99	31,8	24	7,7	
Outono e primavera	14	4,5	24	7,7	<0,001
Verão e outono	63	20,2	9	3	
Presença de insetos hematófagos					
Sim	190	61	60	19,4	
Não	58	18,6	3	1	0,002
Controle de carrapatos					
Sim	176	56,6	57	18,3	
Não	72	23,2	6	2	0,002
Acaricidas usados					
Piretróides	91	29,3	36	11,6	
Organofosforados e avermectinas	99	31,8	24	7,7	<0,001
Avermectinas	58	18,6	3	1	
Época de tratamentos para carrapatos e anaplasmosse					
Outono	72	23,2	6	2	
Primavera e outono	14	4,5	24	7,7	<0,001

Primavera, verão e outono	71	22,8	22	7	
Verão	28	9	2	0,6	
Verão e outono	63	20,2	9	3	
Categorias mais parasitadas por carrapatos					
Vaca prenhe, em lactação e bezerro	14	4,5	24	7,7	
Vaca em lactação	14	4,5	3	1	<0,001
Bezerro	220	70,7	36	11,6	

Fonte: elaborada pela autora, 2017.

Questões que obtiveram valor de $p < 0,05$ foram consideradas com resultado significativo na análise univariada e assim, foram submetidas à análise multivariada, sendo que os fatores que apresentaram multicolinearidade foram excluídos do modelo, por não se determinar qual a real relação entre as variáveis (Tabela 2):

Tabela 2 - Análise multivariada dos fatores associados à infecção por *A. marginale* detectados por meio da PCR em bovinos da raça Crioula Lageana.

Fator de risco	Valor de p	OR	IC 95%	Coeficiente	S.E
Finalidade produtiva da criação	0,017	0,831	0,713 - 0,968	-0,185	0,078
Controle de carrapatos	<0,001	0,066	0,017 – 0,250	-2,724	0,682
Acaricidas usados	0,004	2,114	1,262 – 3,542	0,749	0,263
Categorias mais parasitadas por carrapatos	<0,001	0,567	0,415 – 0,773	-0,568	0,159

Associação significativa ao nível de 5%. OR = Odds ratio (Razão de chance), IC = intervalo de confiança de 95%, S.E. = erro padrão de estimativa. Fonte: elaborada pela autora, 2017.

A análise multivariada, por meio de regressão logística binária objetivou verificar se estes fatores associados são de fato previsores da infecção por *A. marginale*.

5.4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo de prevalência para *A. marginale* em bovinos da raça Crioula Lageana. Os dados epidemiológicos encontrados para esta população revelaram que as propriedades avaliadas estão em situação de estabilidade enzoótica de acordo com Mahoney (1975). Todos os animais mostraram-se assintomáticos no momento da coleta das amostras. Uma vez que os vetores biológicos estejam presentes circulando nos animais e no ambiente, ocorre a manutenção da imunidade contra *A. marginale*, mantendo os animais livres da doença clínica e reforçando a importância de manter o contato dos bovinos com os vetores.

Situações de instabilidade enzoótica são incomuns no Brasil. Na região Sul do país, estudos prévios revelaram alta prevalência de *A. marginale* nos rebanhos, obtendo valores de 92,9% na região de Londrina, no Paraná (ANDRADE et al., 2001). Na região Centro-Sul do Paraná, a soroprevalência para o agente causador da anaplasmosse em bovinos foi de 58,74% pelo teste de ELISA (MARANA et al., 2009), e para a região Noroeste, a prevalência foi de 76,10% em bovinos da raça Nelore (YOSHIHARA et al., 2003). No Sudoeste do Paraná o teste sorológico revelou 24,4% de animais com anticorpos contra *A. marginale* do total de bovinos de raças leiteiras analisados (SOTT et al., 2016), revelando situação de instabilidade enzoótica na região estudada. Estudos que utilizam a sorologia como forma de diagnosticar a infecção detectam anticorpos contra o agente e não a presença deste na circulação sanguínea dos animais no momento da obtenção das amostras, o que pode levar à uma superestimativa da prevalência nos rebanhos.

No estado de Santa Catarina, estudo recente classificou a região do Planalto Catarinense como sendo de instabilidade enzoótica para a anaplasmosse, baseado na técnica de multiplex-PCR com prevalência de 27,24% de amostras positivas (VIEIRA, 2014), inclusive com a ocorrência de um surto da doença nesta região (CANEVER et al., 2014). Este dado, no entanto, não foi confirmado nas propriedades criadoras da raça Crioula Lageana, cuja prevalência obtida foi de 79,74% (Gráfico 1), sendo que esta variação pode estar associada à época de colheita das amostras, uma vez que entre o verão e o outono, período em que foram realizadas as colheitas de sangue para este estudo, há maior eclosão de larvas de carrapatos e consequentemente mais bovinos parasitados (SOUZA et al., 1988), favorecendo a infecção por *A. marginale*. A ausência de um controle regular dos vetores, e a criação extensiva dos animais, favorece o contato constante com o hemoparasito, reforçando sua imunidade contra o agente causador da doença clínica.

O sexo dos animais (Gráfico 2) não possuiu relação com a infecção por *A. marginale* ($p=0,983$), dado este, encontrado também em outros trabalhos (ABDELA et al., 2017; WESONGA et al., 2016). A categoria animal não é considerada como fator capaz de afetar a prevalência da infecção na raça Crioula Lageana. Este fato vai de encontro ao reportado pela literatura, que associa à infecção ao periparto nas vacas, visto que neste período, a concentração de imunoglobulinas no sangue das fêmeas é reduzida. Este estado de imunossupressão, agravado também pelas mudanças hormonais favoreceria a instalação do parasita (SILVA; FONSECA, 2013). No que diz respeito à idade, M'ghirbi et al. (2016), determinaram a prevalência de *A. marginale* por meio de PCR e verificaram que a taxa de infecção dos animais

amostrados foi significativamente maior em animais jovens, quando comparados aos adultos. Para a raça Crioula Lageana esta diferença não foi verificada.

A presença de carapatos nos animais no momento da colheita das amostras não foi considerado estatisticamente como um fator capaz de favorecer a infecção ($p=0,274$). Este fato corrobora os achados de Abdela et al. (2017), que também não encontraram esta associação para a infecção por *A. marginale* e levantaram a hipótese de que para este agente, outros artrópodes sugadores e fômites possam ter papel importante na transmissão. Em áreas da América Central e da África, onde os carapatos vetores não ocorrem, a transmissão mecânica, por meio de fômites, é considerada a principal forma de transmissão da anaplasmosse bovina (FIGUEROA et al., 1998).

Entre os fatores associados à infecção, avaliados por meio de questionário, a finalidade produtiva da criação ($p<0,017$) foi um fator capaz de reduzir as taxas de infecção para *A. marginale*. As propriedades que possuíam, entre outras finalidades, o objetivo de reprodução dos animais, apresentaram as maiores taxas de inoculação. Este dado pode estar associado às alterações causadas pela gestação e lactação das vacas, pois grande parte das amostras colhidas foi proveniente desta categoria. Ainda assim, a finalidade produtiva da criação não eleva o risco de infecção por *A. marginale*, podendo inclusive, ser um fator de controle da doença, principalmente nas propriedades que trabalham exclusivamente com animais que serão destinados à produção de carne e à venda.

Da mesma forma, o controle de carapatos foi significativamente ($p<0,001$) associado como fator de risco para a infecção pelo agente da anaplasmosse. Dos 311 animais avaliados, 56,6% passaram por controle regular de carapatos, sendo discretamente menos propensos ($OR=0,066$) a adquirirem a infecção. Em recente trabalho no Kenya, Wesonga et al (2016), não encontraram relação significativa entre o controle regular de carapatos e a infecção por *A. marginale* na análise multivariada, e atribuiram esse achado à ausência de uma real eficácia dos princípios ativos usados para este controle.

As classes de princípios ativos utilizadas também estão associadas à presença ou não da infecção por *A. marginale* nos bovinos da raça Crioula Lageana ($p=0,004$). Estudo realizado com resistência dos carapatos aos acaricidas no México, demonstrou que estes artrópodes são resistentes à mais de uma classe de acaricidas (FOIL et al. 2004). Na população deste estudo, a classe de acaricida usada ou a combinação de diferentes classes poderia favorecer em mais de duas vezes a chance dos animais serem positivos para o agente da anaplasmosse, principalmente nas propriedades que utilizaram a combinação de organofosforados e avermectinas ($OR=2,114$), o que pode indicar que os carapatos destas propriedades são resistentes à diversas

classes de acaricidas comumente utilizados. A falta de regularidade na aplicação dos acaricidas na maioria das propriedades amostradas pode estar levando à resistência dos carrapatos aos princípios ativos mais utilizados, favorecendo a presença dos carrapatos parasitando os bovinos e assim mantendo as taxas de infecção de *A. marginale*.

De acordo com as informações fornecidas pelos proprietários, ao longo dos anos, a categoria mais infestada por carrapatos é a dos bezerros. A categoria é um fator significante ($p<0,001$) no que diz respeito à infestação por carrapatos e a positividade ou não para *A. marginale*. O efeito da idade, no caso deste estudo, também pode se confundir com o efeito do estado fisiológico. Quando a idade é avaliada em estudos de resistência dos bovinos ao carapato, os animais mais velhos tendem a ser mais suscetíveis à infestação do que os animais jovens (FRAGA et al., 2003; SILVA et al., 2010), o que não se confirmou neste trabalho, de acordo com as observações dos proprietários. Sendo assim, fazem-se necessárias observações ao longo de um determinado período, com contagens de carrapatos em diferentes épocas, para que se confirme este comportamento dos ectoparasitas em cada categoria animal, uma vez que o dado fornecido não coincide com o comportamento das infestações citados na literatura.

A maioria dos fatores associados que apresentaram significância na análise multivariada obtiveram valores de “odds” representando redução nas chances de infecção. Esse dado pode revelar fatores considerados positivos no manejo dos bovinos da raça, que tornaram as chances de infecção para *A. marginale* reduzidas, sem, no entanto eliminar o parasita e mantendo assim uma situação de estabilidade enzoótica nesta população.

5.5 CONCLUSÃO

Revelou-se alta prevalência para a infecção por *A. marginale* pela técnica de PCR em bovinos da raça Crioula Lageana. Verificou-se não haver influência do sexo, da categoria e da infestação por carrapatos nas taxas de infecção. Os principais fatores associados à presença ou ausência de infecção foram a finalidade produtiva da criação, a regularidade no controle de carrapatos, os acaricidas usados e a categoria mais infestada por carrapatos.

5.6 REFERÊNCIAS

ABDELA, N.; IBRAHIM, N.; BEGNA, F. Prevalence, risk factors and vectors identification of bovine anaplasmosis and babesiosis in and around Jimma Town, Southwestern Ethiopia. *Acta Tropica*, 2017. No prelo.

ANDRADE, G.M. et al. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in dairy cattle and, studies on the dynamics of natural infection of Holstein calves in Southern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 155-159, 2001.

BOCK, R.E.; KINGSTON, T. G.; VOS, A.J de. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 7, p. 461-464, 1999.

BRITO, L.G. et al. *Anaplasma marginale* infection in cattle from south-western Amazonia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 249-254, 2010.

BROWN, C.G. Dynamics and impact of tick-borne diseases of cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 29, n. 4 Suppl, p. 1S-3S, 1997.

CANEVER, M.F. et al. First evaluation of an outbreak of bovine babesiosis and anaplasmosis in Southern Brazil using multiplex PCR. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 52, n. 5, p. 507, 2014.

FIGUEROA, J.V. et al. Bovine Babesiosis and Anaplasmosis Follow-up on Cattle Relocated in an Endemic Area for Hemoparasitic Diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 849, n. 1, p. 1-10, 1998.

FOIL, L.D. et al. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 1, p. 163-181, 2004.

FRAGA, A.B. et al. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 1578-1586, 2003.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 109-119, 1995.

JULIANO, R.S. et al. Soroepidemiologia da leucemia bovina (lb) em bovinos curraleiros dos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 3, p. 289-295, 2014.

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

MAHONEY, D.F. The diagnosis of babesiosis in Australia. In: Wells, E.A. (Ed.), Workshop on Hemoparasites (Anaplasmosis and Babesiosis). CIAT, p. 49–62, 1975.

MARANA, E.R.M. et al. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná, Brasil, por um teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 20-26, 2009.

MARTINS, V.M.V. et al. **Raça Crioula Lageana: O esteio de ontem, o labor de hoje e a oportunidade do amanhã**. Ed: ABCCL, Lages. 2009. 80p.

M'GHIRBI, Y. et al. *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in cattle in Tunisia. **Parasites & Vectors**, v. 556, n. 9, p. 1-8, 2016.

OPAS (Organización Panamericana de la Salud). **Bioestatística**: procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, n.18, 1979.

PAIM, F. et al. Selective control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in fipronil-treated cattle raised on natural pastures in Lages, State of Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 13-16, 2011.

SHARMA, A. et al. Detection and assessment of risk factors associated with natural concurrent infection of *Trypanosoma evansi* and *Anaplasma marginale* in dairy animals by duplex PCR in eastern Punjab. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 1, p. 251-257, 2015.

SILVA, A.M. da et al. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1477-1482, 2010.

SILVA, J.B. da; FONSECA, A.H. da. Risk factors for anaplasmosis in dairy cows during the peripartum. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 2, p. 461-465, 2013.

SOTT, T. et al. Enzootic instability for bovine anaplasmosis on family farms located in southwestern Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 497-500, 2016.

SOUZA, A.P. et al. Variação Sazonal de *Boophilus microplus* no Planalto Catarinense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 23, n. 6, p. 627-630, 1988.

VIEIRA, L. L. Prevalência e dinâmica de infecções por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos na região serrana de Santa Catarina. 2014.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina, 2014. 83p.

WESONGA, F. D. et al. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina* infections and associated risk factors in Machakos County, Kenya. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 2, p. 265-272, 2017.

YOSHIHARA, E. et al. Studies of natural infection with *Anaplasma marginale* in nelore cattle in the Umuarama municipality, Paraná State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 1, p. 21-26, 2003.

6 PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR *BABESIA BOVIS* EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA

Resumo

A babesiose bovina, causada pelo protozoário *Babesia bovis*, é uma enfermidade mundialmente distribuída e causadora de grandes prejuízos econômicos para a pecuária. Nas raças nativas, como a raça Criola Lageana, não existem estudos sobre a epidemiologia desta enfermidade. Este trabalho visa a obtenção de dados iniciais sobre a prevalência de *B. bovis* em bovinos da raça Criola Lageana, visando novos estudos acerca da sanidade e tolerância à doenças nesta população. Para a determinação da prevalência de *B. bovis* foram colhidas amostras de sangue de 311 bovinos da raça Criola Lageana, e submetidas à extração de DNA e à PCR com primers específicos para o agente. Os resultados obtidos foram analisados de acordo com o sexo, a categoria dos animais (touros, vacas, novilhas e bezerros) e a presença ou ausência de carapatos parasitando os animais. Aplicou-se questionário epidemiológico aos proprietários para a determinação de possíveis fatores associados à infecção. Obteve-se prevalência de 72,02% (248/311) de infecção por *B. bovis* nos animais da raça Criola Lageana. Não houve diferença significativa para sexo, no entanto, foram observadas diferenças significativas para a presença do hemoparasito de acordo com a categoria, sendo as novilhas menos afetadas que as demais. A presença de carapatos afetou a positividade para o agente. Os fatores significativamente associados à infecção, de acordo com questionário aplicado, foram a finalidade produtiva da criação, o contato com outras espécies animais a regularidade do controle de carapatos e a época de emprego dos tratamentos para os carapatos e para a babesiose. Conclui-se que os bovinos da raça Criola Lageana encontram-se em situação de instabilidade enzoótica para a infecção por *B. bovis* pela técnica de PCR. Verificou-se não haver influência do sexo, no entanto a categoria e a infestação por carapatos afetam as taxas de infecção. Os principais fatores associados à presença ou ausência de infecção foram a finalidade produtiva da criação, o contato com outras espécies animais, a regularidade do controle de carapatos e a época de emprego dos tratamentos para os carapatos e para a babesiose.

Palavras-chave: Recurso genético. Raça Nativa. Epidemiologia.

6.1 INTRODUÇÃO

A pecuária de corte possui grande relevância para a economia brasileira e mundial. Apenas no primeiro trimestre de 2017, mais de 7,37 milhões de cabeças de bovinos foram abatidas no Brasil, sendo 264.190 toneladas de carne destinadas à exportação para os mais diversos países (IBGE, 2017). No entanto, muitas doenças ainda são causadoras de prejuízos à pecuária, como a babesiose, causada pelos organismos *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*.

Os agentes da babesiose bovina estão distribuídos na América Latina de acordo com a distribuição de seu vetor, o carapato *Rhipicephalus microplus* (GUGLIELMONE, 1995). As condições climáticas brasileiras são bastante favoráveis ao desenvolvimento dos ectoparasitos (BARCI et al., 2009), o que facilita a transmissão de hemoparasitos patogênicos. Quando se manifesta clinicamente, a babesiose leva à alta morbidade e mortalidade, além de perda da eficiência produtiva, gerando grandes prejuízos econômicos (MAHMMOD, 2012).

Ainda que estudos prévios sugiram maior resistência inata das linhagens *Bos indicus*, em relação às *Bos taurus*, em se tratando da infestação por carapatos e consequentemente da infecção por hemoparasitos (BOCK et al., 1997; JONSSON, 2006), tem-se observado, que a raça Crioula Lageana, de grande aptidão para corte, oriunda de linhagens *Bos taurus*, possuem grande rusticidade e tolerância à enfermidades, sendo mais resistentes à infestação por ectoparasitos do que animais da raça Aberdeen Angus (CARDOSO et al., 2014).

Além de maior diversidade genética quando comparadas às raças comerciais, as raças nativas são adaptadas às condições ambientais específicas de sua região e em geral, há relatos de grande resistência aos agentes patogênicos locais (MARIANTE et al., 2009).

Este é o primeiro estudo epidemiológico com objetivo de determinar a prevalência da infecção por *B. bovis* em bovinos da raça Crioula Lageana, naturalmente infestados por carapatos, no Planalto Catarinense, região reconhecidamente importante para a pecuária no Sul do Brasil.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Determinação do tamanho amostral

Para a avaliação da prevalência de *Babesia bovis* na população bovina da raça Crioula Lageana, a seguinte fórmula, preconizada pela OPAS (1979), foi utilizada:

$$n_0 = \frac{1,96^2[p(1-p)]}{(d)^2}$$

Onde n_0 é o número de amostras; p a prevalência esperada e d a margem de erro. Admitindo-se prevalência estimada de 50% de amostras positivas, intervalo de confiança de 95% e margem de erro de 5%, o resultado obtido foi de 384 animais. No entanto, por tratar-se de população finita, procedeu-se o seguinte cálculo:

$$n = \frac{N \times n_0}{N + n_0}$$

Onde N é o número total de animais na população, sendo que para a raça Crioula Lageana esse número é de 1500 animais. A partir deste cálculo, chegou-se ao número final de 306 animais a serem amostrados.

6.2.2 Animais e obtenção das amostras

Foram colhidas amostras de sangue de 311 bovinos da raça Crioula Lageana, machos e fêmeas, jovens e adultos, todos registrados na Associação Brasileira de Criadores da Raça Crioula Lageana (ABCCL), oriundos de propriedades núcleos de conservação *in situ*, localizadas no Planalto Catarinense. Os animais foram separados por categorias, tendo sido colhidas amostras de 32 touros (machos com mais de dois anos), 141 vacas (fêmeas com mais de dois anos), 66 novilhas (fêmeas entre um e dois anos) e 72 bezerros (machos e fêmeas de até um ano). A ausência de novilhos deve-se ao fato de as amostras serem oriundas de propriedades núcleo de conservação *in situ* da raça, de modo que machos que não forem destinados à reprodução são vendidos. Para a análise com relação ao sexo, os animais foram separados em 62 machos e 249 fêmeas, sem distinção de idade. Para tal, foram utilizados tubos de coleta à vácuo com anticoagulante EDTA a 10%. Após a colheita, as amostras foram congeladas a -20°C até a extração do DNA.

6.2.3 Exame Físico

O exame físico foi empregado para a verificação de sinais clínicos compatíveis com a doença clínica, onde se aferiu a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal, movimentos ruminais (MR) e coloração das mucosas.

6.2.4 Extração de DNA

As amostras de sangue, após seu descongelamento foram imediatamente submetidas à extração de DNA por meio de kit comercial ReliaPrepTM Blood gDNA Miniprep System (PROMEGA[®]), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, a concentração de cada amostra de DNA foi mensurada por meio de espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific[®]) e diluído para manter-se a uma concentração mínima de 20ng/µL.

6.2.5 Análise molecular

As técnicas de PCR e nested-PCR (n-PCR) foram usadas para a amplificação do DNA de *B. bovis*. Os conjuntos de primers usados nas reações são os descritos por Figueroa et al. (1993). Todas as amostras de DNA foram submetidas às duas reações.

A reação de PCR deu-se em microtubos de 0,2mL, onde se adicionou um volume final de 25 µL de solução, contendo 1U de enzima *Taq* Polimerase GoTaq[®] Hot Start Polymerase, (Promega); 8,5 pmoles de cada primer primer (BoF: 5'-CAC GAG GAA GGA ACT ACC GAT GTT GA-3' e BoR: 5'- CCA AGG AGC TTC AAC GTA CGA GGT CA-3'), 0,2mM de nucleotídeos (dNTPs); 3,5mM de cloreto de magnésio; 5µL de tampão 5X Green GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega); 3µL de DNA (concentração entre 20 e 100ng/µL) e água ultra pura para completar o volume final e ajustar a concentração dos reagentes. Foram utilizados controles positivos e negativos a cada reação, sendo que este último foi utilizado para garantir a qualidade e especificidade da técnica, abordando os mesmos parâmetros citados anteriormente, substituindo apenas o uso de DNA genômico por água ultra pura, livre de DNase. O mesmo mix de reação foi usado para a n-PCR, substituindo-se apenas o DNA dos animais por 2 µL do produto da primeira PCR, e os primers utilizados pelos específicos para a n- PCR (BoFN 5'-TCA ACA AGG TAC TCT ATA TGG CTA CC-3' e BoRN 5'-CTA CCG AGC AGA ACC TTC TTC ACC AT-3').

As condições de temperatura aplicadas no termociclagor (Biocycler[®]) para as duas reações envolveram a desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54,2°C por 1 minuto e 73°C por 1 minuto, e ainda uma extensão final a 73°C por 7 minutos.

A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 2% acrescido do corante Unisafe Dye 20.000x (Uniscience). Na primeira lacuna do gel utilizou-se marcador de peso molecular de 100pb como padrão para determinar o tamanho

das bandas das amostras. As condições da fonte elétrica foram de 140 Volts e 400mA por 01h00min, e visualização mediante exposição à luz ultravioleta. Bandas com tamanho próximo a 350pb foram consideradas positivas para *B. bovis* na primeira reação e bandas com tamanho aproximado de 290pb foram consideradas positivas na segunda reação.

6.2.6 Fatores Associados

Para a determinação dos fatores associados ao desenvolvimento da babesiose por *Babesia bovis*, foi realizada a aplicação de questionário epidemiológico aos proprietários de cada propriedade analisada, contendo perguntas voltadas ao perfil da propriedade.

6.2.7 Análise Estatística

A análise univariada foi realizada para comparar as taxas de infecção por *B. bovis* com o sexo, a categoria dos animais e a presença de carrapatos nos animais no momento da colheita de amostras, utilizando o teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$) e análise da Odds Ratio. O modelo estatístico aplicado para os dados do questionário foi composto por análise univariada, por meio do teste de qui-quadrado ($p < 0,05$). Para as questões com resultado significativo nesta primeira análise, procedeu-se a análise multivariada, por meio de análise de regressão logística ($p < 0,05$), sendo que questões que apresentassem multicolinearidade nesta segunda análise eram excluídas da avaliação, de modo a possibilitar a verificação da associação entre a presença ou ausência do agente e os fatores associados.

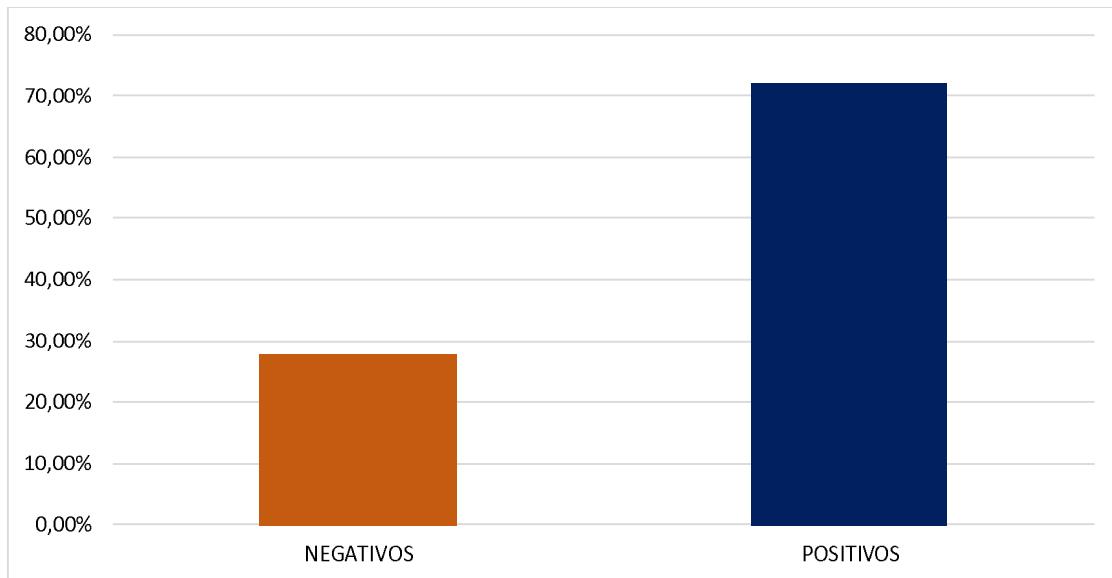
6.2.8 Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob número de protocolo 2461171115, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UDESC, pelo parecer número CAAE 2.068.771.

6.3 RESULTADOS

A prevalência obtida para a infecção por *B. bovis* foi de 72,02% (224/311) (Gráfico 4). Todos os animais positivos foram considerados subclínicos, pois nenhuma alteração nos parâmetros avaliados no exame físico foi verificada, mantendo-se todos dentro dos valores de referência para a espécie (dados não apresentados).

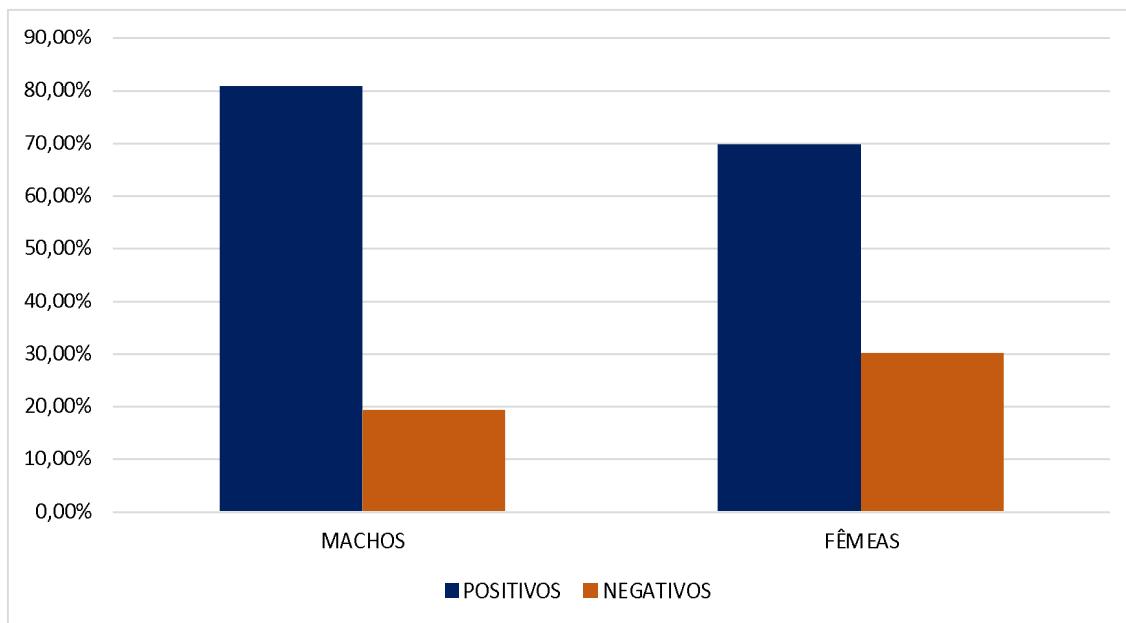
Gráfico 4 - Prevalência de *B. bovis* em 311 bovinos da raça Crioula Lageana, por meio da técnica de PCR no estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: elaborada pela autora, 2017.

Ao serem avaliados o sexo e a categoria dos animais em relação à presença ou ausência da infecção, obteve-se que do total de animais amostrados 249 (249/311; 80,06%) eram fêmeas e destas 174 (174/249; 69,88%) apresentaram-se positivas para o agente. Dos 62 (62/311; 19,94%) machos avaliados, 50 (50/62; 80,65%) apresentaram resultado positivo. Na comparação entre os sexos, não houve diferença significativa ($p=0,126$) na proporção de animais parasitados (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Percentual de animais parasitados por *B. bovis* da raça Crioula Lageana de acordo com o sexo, sendo 249 fêmeas e 62 machos, pela técnica de PCR em Santa Catarina, Brasil.

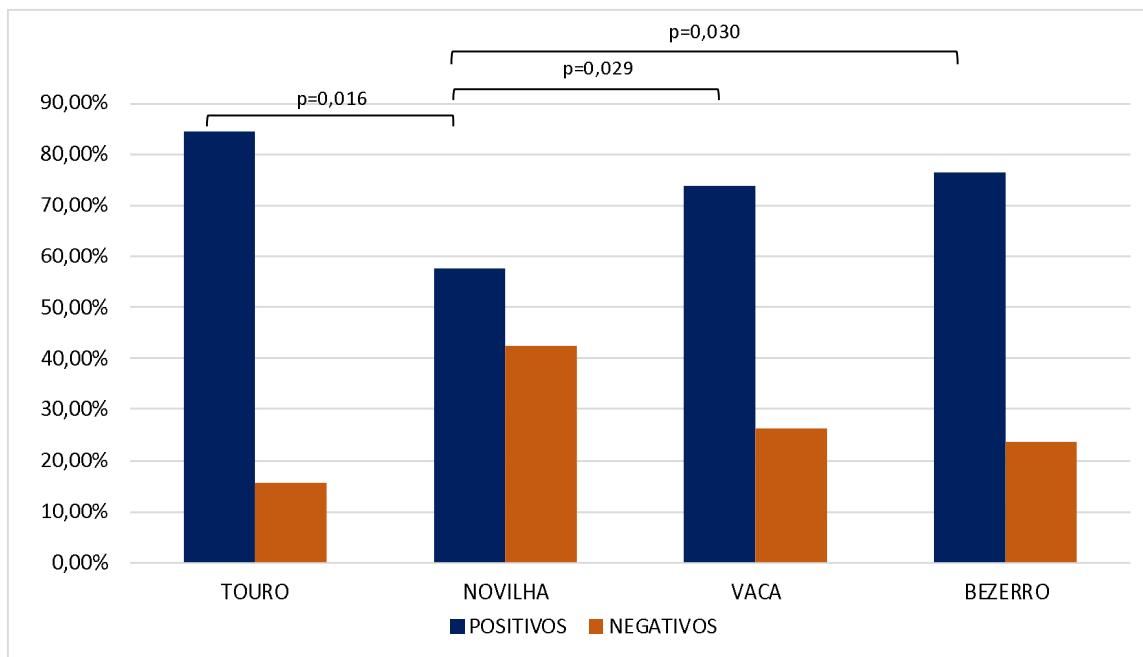


Fonte: elaborada pela autora, 2017.

Dos 32 (32/311; 10,29%) touros avaliados, 27 (27/32; 84,38%) apresentaram-se positivos, bem como das 66 (66/311; 21,22%) novilhas, 38 (38/66; 57,57%) apresentaram o mesmo resultado. Entre as 141 (141/311; 45,33%) vacas, 104 (104/141; 73,76%) apresentaram bandas na eletroforese compatíveis com *B. bovis*, da mesma forma que 55 (55/72; 76,39%) bezerros de um total de 72 (72/311; 23,15%) (Gráfico 6).

Entre as categorias, houve diferença significativa ($p=0,016$) entre touros e novilhas, sendo que para esta população os touros possuíam 3,979 vezes mais chances de terem a infecção pelo agente da babesiose do que as novilhas. Da mesma forma, entre novilhas e vacas também se obteve diferença significativa ($p=0,029$), com 2,071 vezes mais chances das vacas possuírem a infecção em comparação às novilhas. Entre novilhas e bezerros ($p=0,030$), a chance dos bezerros adquirirem a infecção foi 2,384 vezes maior do que para as novilhas.

Gráfico 6 - Percentual de animais parasitados por *B. bovis* da raça Crioula Lageana de acordo com a categoria, sendo 32 touros, 66 novilhas, 141 vacas e 72 bezerros, pela técnica de PCR em Santa Catarina, Brasil.



Avaliou-se a relação entre a presença ou ausência de carrapatos parasitando os animais no momento da colheita de amostras e a positividade ou não para a infecção por *B. bovis*. Esta análise demonstrou haver relação significativa ($p=0,048$) entre as variáveis no teste de qui-quadrado, havendo 1,76 vezes mais chance dos animais com a presença do ectoparasita adquirir o hemoparasito.

Na análise das respostas dos questionários aplicados aos proprietários, a finalidade produtiva da criação, o contato dos bovinos com outras espécies animais, o contato com bovinos de outras propriedades, o período de maior infestação por carrapatos, a presença de insetos hematófagos, o controle de carrapatos, os acaricidas usados e a época de tratamentos para carrapatos e babesiose obtiveram diferença significativa na análise univariada dos fatores associados (Tabela 3):

Tabela 3 - Análise univariada dos fatores associados à infecção por *B. bovis* em bovinos da raça Crioula Lageana.

Variáveis	Infecção por <i>B. bovis</i>				<i>p</i>	
	Positivos		Negativos			
	N	%	N	%		

Número de animais na propriedade					
De 51 a 100	39	12,5	8	2,6	
Mais de 100	185	59,5	79	25,4	0,101
Finalidade produtiva da criação					
Carne, reprodução e venda	103	33,1	62	19,9	
Carne	11	3,5	6	2	
Reprodução e venda	55	17,7	6	2	<0,001
Carne e venda	27	8,7	11	3,5	
Venda	28	9	2	0,6	
Tamanho da propriedade					
De 50 a 100 ha	11	3,5	6	2	
Maior que 100 ha	213	68,5	81	26	0,679
Contato dos bovinos com outras espécies animais					
Equino, cão e ovino	52	16,7	20	6,4	
Suíno	28	9	2	0,6	
Equino e cão	27	8,7	11	3,5	
Equino, suíno, cão e gato	55	17,7	6	2	<0,001
Equino, cão, gato, ave e ovino	51	16,4	42	13,5	
Equino, cão, gato e silvestres	11	3,5	6	2	
Contato com bovinos de outras propriedades					
Sim	134	43,1	37	11,9	
Não	90	28,9	50	16,1	0,009
Reposição de animais					
Próprio rebanho	80	25,7	22	7,1	
Próprio rebanho e outras propriedades	144	46,3	65	20,9	0,104
Assistência veterinária					
Sim	107	34,4	33	10,6	
Não	117	37,6	54	17,4	0,150
Casos anteriores de babesiose					
Sim	79	25,4	31	10	
Não	145	46,6	56	18	0,943
Período de maior infestação por carrapatos					
Outono	66	21,2	12	3,9	
Verão	79	25,4	44	14,1	
Outono e primavera	27	8,7	11	3,5	
Verão e outono	52	16,7	20	6,4	
Presença de insetos hematófagos					
Sim	169	54,3	81	26	
Não	55	17,7	6	2	<0,001
Controle de carrapatos					
Sim	158	50,8	75	24,1	
Não	66	21,2	12	3,9	0,007
Acaricidas usados					
Piretróides	90	28,9	37	11,9	<0,001

Organofosforados e avermectinas	79	25,4	44	14,1	
Avermectinas	55	17,7	6	2	
Época de tratamentos para carapatos e babesiose					
Outono	66	21,2	12	3,9	
Primavera e outono	27	8,7	11	3,5	
Primavera, verão e outono	51	16,4	42	13,5	<0,001
Verão	28	9	2	0,6	
Verão e outono	52	16,7	20	6,4	
Categorias mais parasitadas por carapatos					
Vaca prenhe, em lactação e bezerro	27	8,7	11	3,5	
Vaca em lactação	11	3,5	6	2	0,771
Bezerro	186	59,8	70	22,5	

Fonte: elaborada pela autora, 2017.

Questões que obtiveram valor de $p < 0,05$ foram consideradas com resultado significativo na análise univariada e assim, foram submetidas à análise multivariada, sendo que os fatores que apresentaram multicolinearidade foram excluídos do modelo, por não se determinar qual a real relação entre as variáveis (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise multivariada dos fatores associados à infecção por *B. bovis* em bovinos da raça Crioula Lageana.

Fator de risco	Valor de p	OR	IC 95%	Coeficiente	S.E
Finalidade produtiva da criação	0,042	0,861	0,746 - 0,995	-0,149	0,074
Contato dos bovinos com outras espécies animais	0,002	0,484	0,517 – 0,860	-0,405	0,130
Controle de carapatos	<0,001	0,188	0,074 – 0,480	-1,670	0,477
Acaricidas usados	0,154	1,384	0,885 – 2,163	0,325	0,228
Época de tratamentos para carapatos e babesiose	0,026	0,810	0,673 – 0,975	-0,210	0,094

Associação significativa ao nível de 5%. OR = Odds ratio (Razão de chance), IC = intervalo de confiança de 95%, S.E. = erro padrão de estimativa. Fonte: elaborada pela autora, 2017.

A análise multivariada, por meio de regressão logística binária objetivou verificar se estes fatores de risco são de fato previsores da infecção por *B. bovis*. Neste caso, ao verificar o valor de p de cada previsor, verifica-se que o uso de acaricidas não é um previsor significativo para o modelo, enquanto as demais variáveis são consideradas significativas.

6.4 DISCUSSÃO

A prevalência de *B. bovis* encontrada para esta população encontra-se abaixo do preconizado por Mahoney et al. (1975), para que se obtenha a condição de estabilidade enzoótica. Isso pode tornar os animais mais suscetíveis à doença clínica e ao aparecimento de surtos. Esse comportamento, no entanto, não se observa para os animais da raça Crioula Lageana, uma vez que não foram relatados surtos prévios de babesiose pelos proprietários e no momento da colheita de amostras e do exame físico dos animais, todos se encontravam clinicamente sadios.

No Sul do Brasil, mais especificamente no Sudoeste do Paraná, Elias et al. (2016) encontraram alta prevalência de *B. bovis* nos animais amostrados, chegando a 95,5% de animais positivos no teste sorológico de ELISA. Osaki et al. (2002) no município de Umuarama, Noroeste paranaense, obtiveram 64,2% dos animais analisados soropositivos para *B. bovis* pelo mesmo teste, resultado este que se aproxima do encontrado para a raça Crioula Lageana.

No Planalto Norte de Santa Catarina, o rebanho leiteiro apresentou 76,8% de positividade para *B. bovis* pelo teste de Imunofluorescência Indireta (SOUZA et al., 2002). Recentemente, verificou-se um surto de babesiose e anaplasmosose ocorrido em Ponte Alta, Santa Catarina, com 18,2% dos animais atendidos confirmados como positivos para a presença de *B. bovis* pela técnica de Multiplex-PCR (CANEVER et al., 2014).

Outro estudo avaliou a prevalência dos agentes do Complexo Tristeza Parasitária e verificou que 29,57% do rebanho bovino do Planalto Catarinense é positivo para *B. bovis* pela mesma técnica de Multiplex-PCR, sendo que estes índices representam situação de instabilidade enzoótica para a babesiose na região, fazendo-se necessário o controle dos vetores (VIEIRA, 2014). Apesar dos animais não estarem dentro do valor mínimo para a condição de estabilidade enzoótica, nenhum surto de babesiose foi reportado nas propriedades criadoras da raça Crioula Lageana, o que pode suscitar hipóteses de que a raça possua particularidades que lhe conferem a tolerância à infecção por hemoparasitos, assim como foi determinada a resistência superior aos ectoparasitos quando comparada com a raça Aberdeen Angus (CARDOSO et al., 2014).

O fator sexo não foi relacionado à infecção por *B. bovis* na raça Crioula Lageana (Gráfico 2). A categoria, no entanto, revelou diferença significativa ($p<0,017$) (Gráfico 3). Touros e vacas são mais suscetíveis à infecção quando comparados às novilhas, fato este que pode estar relacionado à idade dos animais. Trueman e Blight (1978), observaram que animais com mais de dois anos seriam mais afetados pelos hemoparasitos, reiterando os dados encontrados para os bovinos Crioulos Lageanos. Relataram também que novilhos, com idade de um ano e meio, reagiram de forma intermediária entre vacas e bezerros. As novilhas da raça

Crioula Lageana apresentaram, no entanto menores chances de infecção quando comparadas à vacas e bezerros. A imunidade inata, presente nos bezerros, também é um fator que contribui para que sejam menos afetados pela doença clínica quando infectados (GOFF et al., 2001). Os bezerros do presente trabalho, no entanto, não demonstraram serem menos suscetíveis à infecção por *B. bovis* quando comparados às demais categorias.

A presença de carrapatos do gênero *Rhipicephalus* parasitando os animais é um fator que afeta a prevalência por *B. bovis*. A época de colheita das amostras também está relacionada à maior presença de carrapatos parasitando os animais. O outono, no Brasil, é considerado como a estação em que ocorrem as maiores taxas de infestação por carrapatos (SOUZA et al., 1988; KASAI et al., 2000). Uma vez que as amostras deste estudo foram colhidas nesta época, pode-se inferir que este tenha sido o momento de maior infestação por carrapatos nestes animais e consequentemente a época de maiores taxas de infecção por *B. bovis*. Para os bovinos da raça Crioula Lageana, a presença de carrapatos parasitando os animais está ligada à infecção por *B. bovis*, comportamento que foi descrito por Lorusso et al. (2013). A carga de carrapatos, no entanto, não influiu no nível de parasitemia para *B. bovis* (GIGLIOTTI et al., 2016).

Na análise dos fatores associados, a partir das respostas dos produtores ao questionário específico, revelou que a finalidade produtiva da criação é considerada um fator que reduz as chances de infecção por *B. bovis*. Animais destinados à produção de carne, à reprodução e à venda, apresentaram as maiores taxas de infecção. A literatura consultada não traz explicação para este fato, no entanto, a idade desses animais pode influenciar o resultado. Os animais da raça Crioula Lageana são abatidos com idade média de dois anos ou mais, e aqueles mantidos para a reprodução acabam sendo mais longevos. Por se tratarem de animais mantidos em núcleos de conservação da raça, muitos também são vendidos com idades superiores a dois anos. Uma vez que animais mais velhos são mais propensos à infecção por *B. bovis*, a idade explicaria a influência da finalidade produtiva sobre a prevalência nestes animais, sem, no entanto ser considerada um fator de elevação da positividade para o agente.

Devido ao sistema extensivo de criação, grande parte dos animais acabou entrando em contato com outras espécies animais, sendo as mais comuns a equina, suína, canina, felina e a ovina. O carrapato *Rhipicephalus microplus*, pode ter como hospedeiros equinos e ovinos que albergam larvas e ninfas (MEHLHORN, 2015). A convivência entre estas espécies e a consequente troca de hospedeiro pelo ectoparasito pode explicar as reiteradas infestações por carrapatos, levando à aquisição de imunidade dos animais à infestação por carrapatos e à infecção por *B. bovis*.

O controle de carapatos e a época dos tratamentos para a babesiose também influencia as taxas de infecção por *B. bovis*. Rotinas adequadas de controle de carapatos nas propriedades podem reduzir as chances de infecção por *Babesia* spp, como reportado na Tailândia (JIRAPATTHARASATE et al., 2016). A época de emprego dos tratamentos também está associada às taxas de inoculação reduzidas. Tratamentos realizados na primavera, verão e outono levam à menores taxas de positividade para *B. bovis*, pois coincidem com as épocas de maior infestação dos animais por carapatos, conforme descrito por Souza et al. (1988). Estudos relacionados à dinâmica da infestação por carapatos nesta população, no entanto, se fazem necessários.

6.5 CONCLUSÃO

O presente estudo revelou prevalência abaixo do limite de estabilidade enzoótica para a infecção por *Babesia bovis* pela técnica de PCR em bovinos da raça Crioula Lageana. Verificou-se não haver influência do sexo nas taxas de infecção, no entanto, com relação à categoria dos animais, as novilhas apresentaram a menor propensão à infecção quando comparadas às demais categorias. Os principais fatores de risco associados à presença ou ausência de infecção foram a finalidade produtiva da criação, o contato com outras espécies animais, a regularidade do controle de carapatos e a época de emprego dos tratamentos para os carapatos e para a babesiose.

6.6 REFERÊNCIAS

BARCI, L.A.G. et al. Determinação da CL90 e TL90 do isolado IBCB66 de *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acarí: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p.34-39, 2009.

BOCK, R. E. et al. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 5, p. 337-340, 1997.

CANEVER, M.F. et al. First evaluation of an outbreak of bovine babesiosis and anaplasmosis in Southern Brazil using multiplex PCR. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 52, n. 5, p. 507, 2014.

CARDOSO, C.P. et al. Resistance against ectoparasites in Crioulo Lageano and crossbred Angus cattle in southern Brazil under natural conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 141-146, 2014.

ELIAS, F. et al. Levantamento sorológico dos agentes da tristeza parasitária em bovinos de leite na região Sudoeste do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 102-103, 2016.

FIGUEROA, J. V. et al. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 1-2, p. 69-81, 1993.

GIGLIOTTI, R. et al. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 657-662, 2016.

GOFF, W. L. et al. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. **Parasite Immunology**, v. 23, n. 9, p. 463-471, 2001.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 109-119, 1995.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE: Estatísticas da produção pecuária**. São Paulo. 2017.

JIRAPATTHARASATE, C. et al. Molecular epidemiology of bovine *Babesia* spp. and *Theileria orientalis* parasites in beef cattle from northern and northeastern Thailand. **Parasitology International**, v. 65, n. 1, p. 62-69, 2016.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1-10, 2006.

KASAI, N. et al. Populational dynamics of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) in dairy cattle under intensively grazing elephant grass pasture. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 5, p. 453-458, 2000.

LORUSSO, V. et al. Ixodid ticks of traditionally managed cattle in central Nigeria: where *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* does not dare (yet?). **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 171, 2013.

MAHMMOD, Y. Molecular detection of natural *Babesia bovis* infection from clinically infected and apparently healthy water buffaloes (*Bubalus bubalis*) and crossbred cattle. **Journal of Buffalo Science**, v. 1, n. 1, p. 55-60, 2012.

MAHONEY, D.F. The diagnosis of babesiosis in Australia. In: Wells, E.A. (Ed.), Workshop on Hemoparasites (Anaplasmosis and Babesiosis). **CIAT**, p. 49–62, 1975.

MARIANTE, A. da S. et al. Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil. **Livestock Science**, v. 120, n. 3, p. 204-212, 2009.

MEHLHORN, H. *Rhipicephalus* Species. In: _____. **Encyclopedia of Parasitology**, Springer, 2015. p. 1-8.

OPAS (Organización Panamericana de la Salud). **Bioestadística**: procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo. Buenos Aires: Organizacion Panamericana de la Salud, n.18, 1979.

OSAKI, S.C. et al. Ocorrência de anticorpos anti *Babesia bovis* e estudo sobre a infecção natural em bovinos da raça nelore, na região de Umuarama, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 2, p. 77-83, 2002.

SOUZA, A. P. et al. Variação Sazonal de *Boophilus microplus* no Planalto Catarinense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 23, n. 6, p. 627-630, 1988.

SOUZA, A.P. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Babesia* em bovinos no Planalto Norte de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 1, n. 1, p. 21-23, 2002.

TRUEMAN, K. F.; BLIGHT, G. W. The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, n. 6, p. 301-305, 1978.

VIEIRA, L. L. **Prevalência e dinâmica de infecções por Anaplasma marginale, Babesia bovis e Babesia bigemina em bovinos na região serrana de Santa Catarina**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina, 2014. 83p.

7 PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR *BABESIA BIGEMINA* EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA

Resumo

A babesiose bovina, causada pelo protozoário *Babesia bigemina*, é uma enfermidade mundialmente distribuída e causadora de grandes prejuízos econômicos para a pecuária. Nas raças nativas, como a raça Criola Lageana, não existem estudos sobre a epidemiologia desta enfermidade. O trabalho tem objetivo de determinar a prevalência de *B. bigemina* em bovinos da raça Criola Lageana, visando estudos acerca da sanidade e tolerância à doenças nesta população. Foram colhidas amostras de sangue de 311 bovinos da raça Criola Lageana, sendo submetidas à extração de DNA e à PCR com primers específicos para a detecção do agente. Os animais foram divididos de acordo com o sexo, categoria e a presença ou ausência de carapatos no momento da colheita. Para a determinação de possíveis fatores de associados para a infecção aplicou-se um questionário epidemiológico aos proprietários. Obteve-se prevalência de 59,81% (186/311) de infecção por *B. bigemina* nos bovinos da raça Criola Lageana. Foram observadas diferenças significativas para a presença do hemoparasito de acordo com a categoria, com touros e bezerros sendo mais acometidos que vacas e novilhas; o sexo, sendo os machos mais afetados, e a presença de carapatos nos animais. Os fatores associados à infecção que apresentaram diferenças significativas foram o contato com outras espécies animais, como a equina, felina, canina e a ovina e espécies de aves e a regularidade da assistência veterinária. Conclui-se que os bovinos da raça Criola Lageana encontram-se em situação de instabilidade enzoótica, com baixa prevalência para a infecção por *B. bigemina* pela técnica de PCR. Verificou-se haver influência do sexo masculino, da categoria (touros e bezerros) e da infestação por carapatos na prevalência da infecção. Os principais fatores associados à presença ou ausência de infecção foram o contato com outras espécies animais e a regularidade da assistência veterinária.

Palavras-chave: Bovino de corte. PCR. *Rhipicephalus microplus*.

7.1 INTRODUÇÃO

A babesiose é uma enfermidade mundialmente distribuída, transmitida por artrópodes, sendo as regiões de clima tropical e subtropical as mais afetadas (FIGUEROA et al., 1998). No Brasil, a babesiose é causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e seu único vetor é o carapato *Rhipicephalus microplus* (GUGLIELMONE, 1995). Possui grande importância econômica devido às perdas causadas pela queda de produtividade, custos com controle, tratamento e mortalidade de animais, além de influenciar o comércio internacional de bovinos (BOCK et al., 2004).

Com relação ao hospedeiro, sabe-se que alguns grupos genéticos possuem resistência ao carapato causador da babesiose. Esta característica já foi descrita para a raça Crioula Lageana (CARDOSO et al., 2014), e junto de suas características produtivas e de rusticidade, demonstra a qualidade da raça como fonte de material genético para o melhoramento dos rebanhos bovinos. A resistência à babesiose, ainda foi pouco estudada, no entanto, alguns estudos associam as variações de suscetibilidade à raça dos animais (BOCK et al., 1997, 1999; AGUIRRE et al., 1990).

Ainda não se sabe quais genes estão de fato envolvidos na resistência ao carapato e à babesiose, no entanto, esta característica é considerada hereditária. Caso se comprove que a raça dos animais possui relação com a resistência à babesiose, a escolha de raças resistentes nos programas de melhoramento pode tornar-se uma ferramenta de controle da enfermidade (BILHASSI et al., 2014).

A aplicação da técnica de PCR para o diagnóstico da infecção por *B. bigemina* permite identificar animais portadores saudáveis e assim determinar a prevalência de forma mais acurada (OLIVEIRA-SEQUÉIRA et al., 2005; BULING et al., 2007).

Este estudo objetiva apresentar o levantamento de dados epidemiológicos da prevalência da infecção por *B. bigemina* em animais da raça Crioula Lageana por meio de técnicas moleculares e os fatores associados à aquisição do agente nas propriedades criadoras e conservadoras da raça no estado de Santa Catarina, Brasil.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Determinação do tamanho amostral

Para a avaliação da prevalência de *Babesia bigemina* na população bovina da raça Crioula Lageana, a seguinte fórmula, preconizada pela OPAS (1979), foi utilizada:

$$n_0 = \frac{1,96^2 [p(1-p)]}{(d)^2}$$

Onde n_0 é o número de amostras; p a prevalência esperada e d a margem de erro. Admitindo-se prevalência estimada de 50% de amostras positivas, intervalo de confiança de 95% e margem de erro de 5%, o resultado obtido foi de 384 animais. No entanto, por tratar-se de uma população finita, procedeu-se o seguinte cálculo:

$$n = \frac{N \times n_0}{N + n_0}$$

Onde N é o número total de animais na população, sendo que para a raça Crioula Lageana esse número é de 1500 animais. A partir deste cálculo, chegou-se ao número final de 306 animais a serem amostrados.

7.2.2 Animais e obtenção das amostras

Foram colhidas amostras de sangue de 311 bovinos da raça Crioula Lageana, machos e fêmeas, jovens e adultos, todos registrados na Associação Brasileira dos Criadores da Raça Crioula Lageana (ABCCL), oriundos de propriedades núcleos de conservação *in situ*, localizadas no Planalto Catarinense. Os animais foram separados por categorias, tendo sido colhidas amostras de 32 touros (machos com mais de dois anos), 141 vacas (fêmeas com mais de dois anos), 66 novilhas (fêmeas entre um e dois anos) e 72 bezerros (machos e fêmeas de até um ano). A ausência de novilhos deve-se ao fato de as amostras serem oriundas de propriedades núcleo de conservação *in situ* da raça, de modo que machos que não forem destinados à reprodução são vendidos. Para a análise com relação ao sexo, os animais foram separados em 62 machos e 249 fêmeas, sem distinção de idade. Para tal, foram utilizados tubos de coleta à vácuo com anticoagulante EDTA a 10%. Após a colheita, as amostras foram congeladas a -20°C até a extração do DNA

7.2.3 Exame Físico

O exame físico foi empregado para a verificação de sinais clínicos compatíveis com a doença clínica, onde se aferiu a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), movimentos ruminais (MR), temperatura retal e coloração das mucosas.

7.2.4 Extração de DNA

As amostras de sangue, após seu descongelamento foram imediatamente submetidas à extração de DNA por meio de kit comercial ReliaPrepTM Blood gDNA Miniprep System (PROMEGA[®]), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, a concentração de cada amostra de DNA foi mensurada por meio de espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific[®]) e diluído para manter-se à concentração mínima de 20ng/ μ L.

7.2.5 Análise molecular

As técnicas de PCR e nested-PCR (n-PCR) foram usadas para a amplificação do DNA de *B. bigemina*. Os conjuntos de primers usados nas reações são os descritos por Figueroa et al. (1993). Todas as amostras de DNA foram submetidas às duas reações.

A reação de PCR deu-se em microtubos de 0,2mL, onde adicionou-se um volume final de 25 μ L de solução, contendo 1U de enzima *Taq* Polimerase GoTaq[®] Hot Start Polymerase, (Promega); 8,5 pmoles de cada primer (BiIA: 5'-CAT CTA ATT TCT CTC CAT ACC CCT CC-3' e BiIB: 5'-CCT CGG CTT CAA CTC TGA TGC CAA AG -3'), 0,2mM de nucleotídeos (dNTPs); 3,5mM de cloreto de magnésio; 5 μ L de tampão 5X Green GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega); 3 μ L de DNA (concentração entre 20 e 100ng/ μ L) e água ultra pura para completar o volume final e ajustar a concentração dos reagentes. Foram utilizados controles positivos e negativos a cada reação, sendo que este último foi utilizado para garantir a qualidade e especificidade da técnica, abordando os mesmos parâmetros citados anteriormente, substituindo apenas o uso de DNA genômico por água ultra pura, livre de DNase. O mesmo mix de reação foi usado para a n-PCR, substituindo-se apenas o DNA dos animais por 2 μ L do produto da primeira PCR, e os primers utilizados pelos específicos para a n- PCR (BiIAN: 5'-CGC AAG CCC AGC ACG CCC CGG TGC-3' e BiIBN: 5'-CCG ACC TGG ATA GGC TGT GTG ATG-3').

As condições de temperatura aplicadas no termociclagor (Biocycler[®]) para as duas reações envolveram a desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54,2°C por 1 minuto e 73°C por 1 minuto, e ainda uma extensão final a 73°C por 7 minutos.

A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 2% acrescido do corante Unisafe Dye 20.000x (Uniscience). Na primeira lacuna do gel utilizou-se marcador de peso molecular de 100pb como padrão para determinar o tamanho

das bandas das amostras. As condições da fonte elétrica foram de 140 Volts e 400mA por 01h00min, e visualização mediante exposição à luz ultravioleta. Bandas com tamanho próximo a 278pb foram consideradas positivas para *B. bigemina* na primeira reação e bandas com tamanho aproximado de 170pb foram consideradas positivas na segunda reação.

7.2.6 Fatores Associados

Para a determinação dos fatores associados ao desenvolvimento da babesiose por *Babesia bigemina*, foi realizada a aplicação de questionário epidemiológico aos proprietários de cada propriedade analisada, contendo perguntas voltadas ao perfil da propriedade.

7.2.7 Análise Estatística

A análise univariada foi realizada para comparar as taxas de infecção por *B. bigemina* com o sexo, a categoria dos animais e a presença de carrapatos nos animais no momento da colheita de amostras, utilizando o teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$) e análise da Odds Ratio. O modelo estatístico aplicado para os dados do questionário foi composto por análise univariada, por meio do teste de qui-quadrado ($p < 0,05$). Para as questões com resultado significativo nesta primeira análise, procedeu-se a análise multivariada, por meio de análise de regressão logística ($p < 0,05$), sendo que questões que apresentassem multicolinearidade nesta segunda análise foram excluídas da avaliação, de modo a possibilitar a verificação da associação entre a presença ou ausência do agente e os fatores associados.

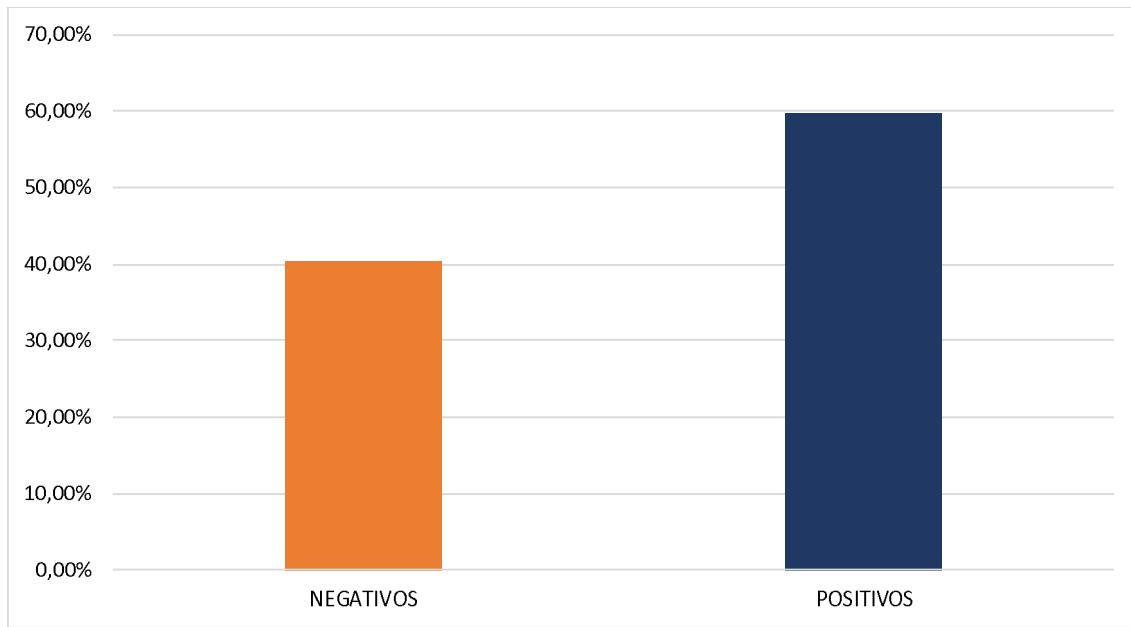
7.2.8 Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob número de protocolo 2461171115, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UDESC, pelo parecer número CAAE 2.068.771.

7.3 RESULTADOS

A prevalência de amostras positivas foi de 59,81% (186/311) para *B. bigemina* (Gráfico 7). Todos os animais positivos foram considerados subclínicos, pois nenhuma alteração nos parâmetros avaliados no exame físico foi verificada, mantendo-se todos dentro dos valores de referência para a espécie (dados não apresentados).

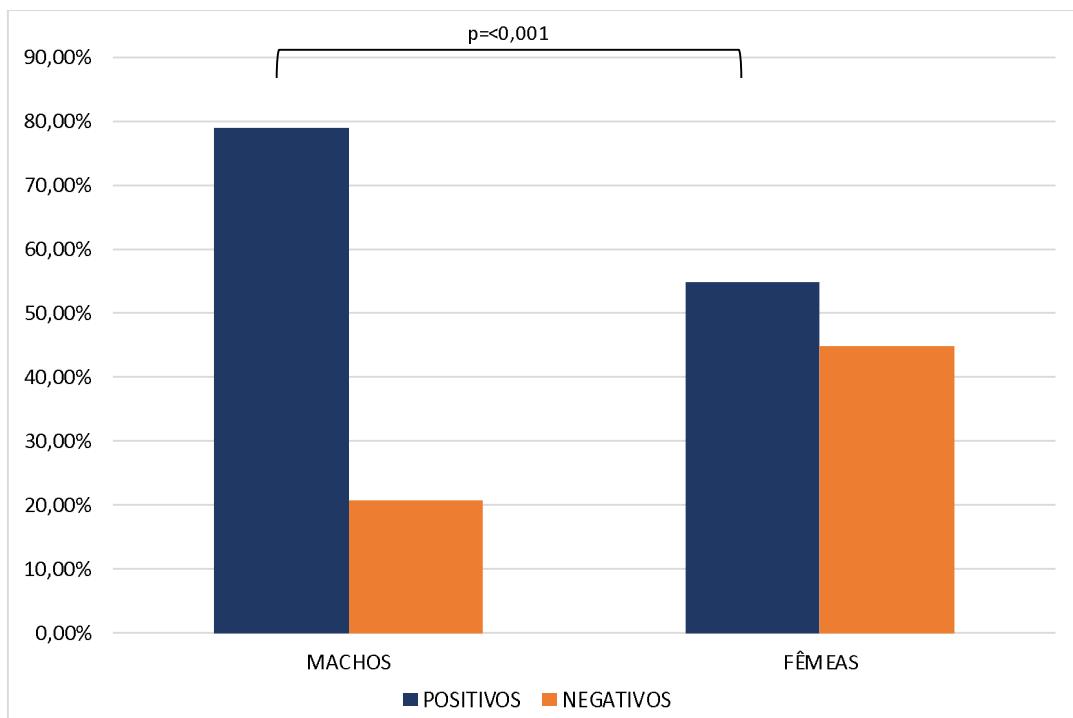
Gráfico 7 - Prevalência da infecção por *Babesia bigemina* em 311 bovinos da raça Crioula Lageana, determinada pela técnica de PCR, no estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: elaborada pela autora, 2017.

Ao serem avaliados o sexo e a categoria dos animais em relação à presença ou ausência da infecção, obteve-se que do total de animais amostrados 249 (249/311; 80,06%) eram fêmeas e destas 137 (137/249; 55,02%) apresentaram-se positivas para o agente. Dos 62 (62/311; 19,94%) machos avaliados, 49 (49/62; 79,03%) apresentaram resultado positivo. Na comparação entre os sexos, houve diferença significativa ($p<0,001$) nas taxas de animais parasitados, e os machos apresentaram 3,357 vezes mais chances de estarem parasitados do que as fêmeas (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Percentual de animais parasitados por *B. bigemina* detectados pela técnica de PCR, da raça Crioula Lageana de acordo com o sexo, sendo 249 fêmeas e 50 machos, no estado de Santa Catarina, Brasil.

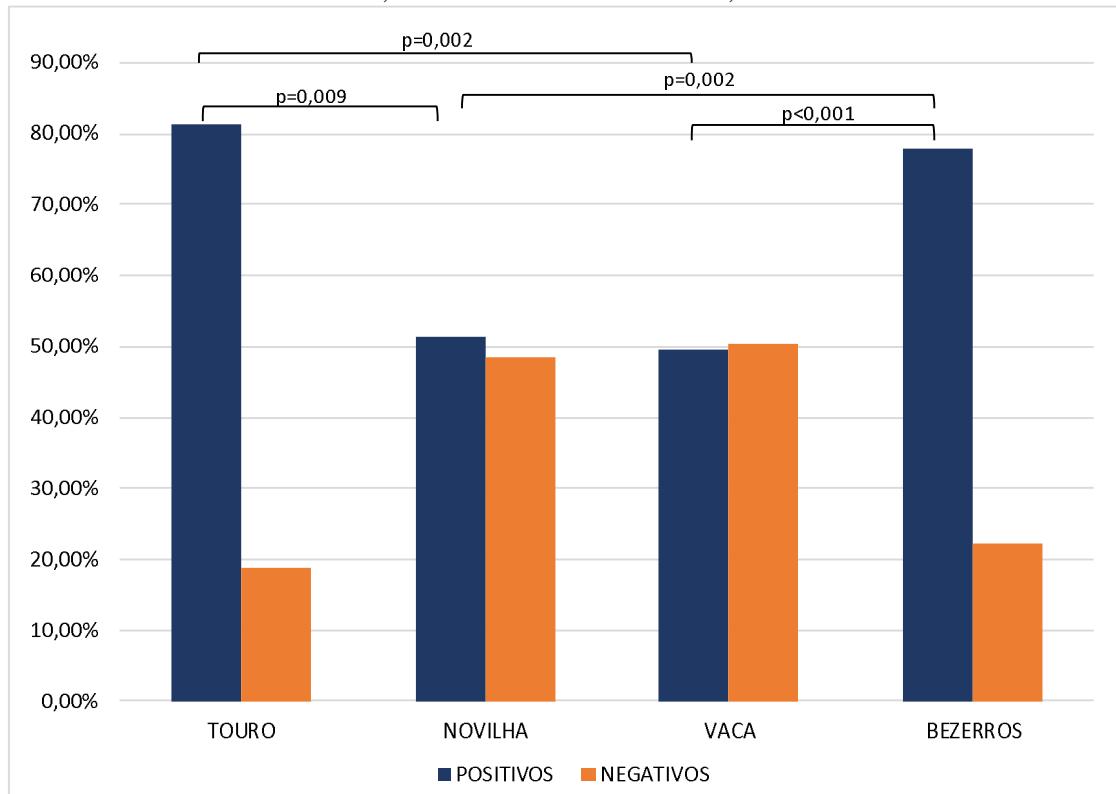


Os valores de p inseridos no gráfico são referentes aos grupos que obtiveram diferenças significativas. Fonte: elaborada pela autora, 2017.

Dos 32 (32/311; 10,29%) touros avaliados, 26 (26/32; 81,25%) apresentaram-se positivos, bem como das 66 (66/311; 21,22%) novilhas, 34 (34/66; 51,52%) apresentaram o mesmo resultado. Entre as 141 (141/311; 45,33%) vacas, 70 (70/141; 49,65%) apresentaram bandas na eletroforese compatíveis com *B. bigemina*, da mesma forma que 56 (56/72; 77,78%) bezerros de um total de 72 (72/311; 23,15%) (Gráfico 9).

Entre as categorias, houve diferença significativa ($p=0,009$) entre touros e novilhas, sendo que para esta população os touros possuem 4,078 vezes mais chances de desenvolverem a infecção pelo agente da babesiose do que as novilhas. Da mesma forma, entre touros e vacas obteve-se diferença significativa ($p=0,002$), com 4,395 vezes mais chances dos touros possuírem a infecção em comparação às vacas. Entre novilhas e bezerros ($p=0,002$), a chance dos bezerros adquirirem a infecção é 3,294 vezes maior do que para as novilhas. As vacas também apresentaram diferença significativa ($p<0,001$) em relação aos bezerros, sendo que os bezerros tem 3,550 vezes maior chance de serem acometidos do que as vacas.

Gráfico 9 - Percentual de bovinos parasitados por *B. bigemina*, por meio da técnica de PCR, da raça Crioula Lageana de acordo com a categoria, sendo 32 touros, 66 novilhas, 141 vacas e 72 bezerros, no estado de Santa Catarina, Brasil.



Os valores de p inseridos no gráfico são referentes aos grupos que obtiveram diferenças significativas. Fonte: elaborada pela autora, 2017.

Avaliou-se também a relação entre a presença ou ausência de carapatos parasitando os animais no momento da colheita de amostras e a positividade ou não para a infecção por *B. bigemina*. Esta análise demonstrou haver relação significativa ($p=0,006$) entre as variáveis no teste de qui-quadrado, havendo 2,002 vezes mais chance dos animais com a presença do ectoparasita adquirir o hemoparásito.

Na análise das respostas dos questionários aplicados aos proprietários, a finalidade produtiva da criação, o contato dos bovinos com outras espécies animais, a assistência veterinária, o período de maior infestação por carapatos, época de tratamentos para carapatos e babesiose e as categorias mais parasitadas por carapatos obtiveram diferença significativa na análise univariada dos fatores associados (Tabela 5):

Tabela 5 - Análise univariada dos fatores associados à infecção por *B. bigemina* em bovinos da raça Crioula Lageana.

Variáveis	Infecção por <i>B. bigemina</i>	p
-----------	---------------------------------	---

	<i>Positivos</i>	<i>Negativos</i>		
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Número de animais na propriedade				
De 51 a 100	31	10	16	5,2
Mais de 100	155	49,8	109	35
Finalidade produtiva da criação				
Carne, reprodução e venda	88	28,3	77	24,8
Carne	12	3,9	5	1,6
Reprodução e venda	33	10,6	28	9
Carne e venda	34	10,9	4	1,3
Venda	19	6,1	11	3,5
Tamanho da propriedade				
De 50 a 100 ha	12	3,9	5	1,6
Maior que 100 ha	174	55,9	120	38,6
Contato dos bovinos com outras espécies animais				
Equino, cão e ovino	40	12,9	32	10,3
Suíno	19	6,1	11	3,5
Equino e cão	34	10,9	4	1,3
Equino, suíno, cão e gato	33	10,6	28	9
Equino, cão, gato, ave e ovino	48	15,4	45	14,5
Equino, cão, gato e silvestres	12	3,9	5	1,6
Contato com bovinos de outras propriedades				
Sim	107	34,4	64	20,6
Não	79	25,4	61	19,4
Reposição de animais				
Próprio rebanho	59	19	43	13,8
Próprio rebanho e outras propriedades	127	40,8	82	26,4
Assistência veterinária				
Sim	93	29,9	47	15,1
Não	93	29,9	78	25,1
Casos anteriores de babesiose				
Sim	74	23,8	36	11,6
Não	112	36	89	28,6
Período de maior infestação por carrapatos				
Outono	45	14,5	33	10,6
Verão	67	21,5	56	18
Outono e primavera	34	10,9	4	1,3
Verão e outono	40	12,9	32	10,3
Presença de insetos hematófagos				
Sim	153	49,2	97	31,2
Não	33	10,6	28	9
Controle de carrapatos				
Sim	141	45,3	92	29,6
Não	45	14,5	33	10,6
Acaricidas usados				

Piretróides	86	27,7	41	13,2	
Organofosforados e avermectinas	67	21,5	56	18	0,061
Avermectinas	33	10,6	28	9	
Época de tratamentos para carrapatos e babesiose					
Outono	45	14,5	33	10,6	
Primavera e outono	34	10,9	4	1,3	
Primavera, verão e outono	48	15,4	45	14,5	0,002
Verão	19	6,1	11	3,5	
Verão e outono	40	12,9	32	10,3	
Categorias mais parasitadas por carrapatos					
Vaca prenhe, em lactação e bezerro	34	10,9	4	1,3	
Vaca em lactação	12	3,9	5	1,6	<0,001
Bezerro	140	45	116	37,3	

Fonte: elaborada pela autora, 2017.

Questões que obtiveram valor de $p < 0,05$ foram consideradas com resultado significativo na análise univariada e assim, foram submetidas à análise multivariada, sendo que os fatores que apresentaram multicolinearidade foram excluídos do modelo, por não se determinar qual a real relação entre as variáveis (Tabela 6):

Tabela 6 - Análise multivariada dos fatores associados à infecção por *B. bigemina* em bovinos da raça Crioula Lageana.

Fator de risco	Valor de p	OR	IC 95%	Coeficiente	S.E
Finalidade produtiva da criação	0,259	1,074	0,949 – 1,217	0,072	0,064
Contato dos bovinos com outras espécies animais	0,037	1,570	1,027 – 2,401	0,451	0,217
Assistência veterinária	0,009	6,770	1,596 – 28,715	1,912	0,737
Época de tratamentos para carrapatos e babesiose	0,074	0,861	0,730 – 1,015	-0,150	0,084

Associação significativa ao nível de 5%. OR = Odds ratio (Razão de chance), IC = intervalo de confiança de 95%, S.E. = erro padrão de estimativa. Fonte: elaborada pela autora, 2017.

A análise multivariada, por meio de regressão logística binária, objetivou verificar se estes fatores de risco são de fato previsores da infecção por *B. bigemina*. Neste caso, ao verificar o valor de p de cada previsor, verifica-se que a finalidade produtiva da criação e a época de tratamentos para carrapatos e para a babesiose, não são previsores significativos para o modelo, enquanto as demais variáveis são consideradas significativas.

7.4 DISCUSSÃO

A população da raça Crioula Lageana no Brasil está concentrada na região Sul, no Planalto de Santa Catarina, onde foi originada e desenvolveu rusticidade ao longo dos anos (FINO et al., 2013). Apesar da importância como fonte genética de alta qualidade, ainda são escassos os trabalhos que visam conhecer o perfil sanitário da raça e seu comportamento frente às mais diversas enfermidades (CARDOSO et al., 2013; CARDOSO et al., 2014; FINO et al., 2013).

As raças taurinas são tidas como as mais susceptíveis aos carrapatos e à babesiose (JONSSON et al. 2008; PIPER et al., 2010), a raça Crioula Lageana, no entanto, demonstrou ser resistente à infecção por ectoparasitos (CARDOSO et al., 2014) e futuros estudos pretendem verificar a tolerância à babesiose e outras enfermidades.

No Sul do Brasil, mais especificamente no Sudoeste do Paraná, Elias et al. (2016) encontraram alta prevalência de *B. bigemina* nos animais de aptidão leiteira amostrados, obtendo valores de 96,6%, respectivamente de animais positivos no teste sorológico de ELISA. O resultado contradiz o observado neste trabalho, no entanto, há que se verificar as diferenças entre as metodologias utilizadas. Testes sorológicos avaliam a presença de anticorpos contra o agente, ao passo que a PCR possibilita detectar a presença do próprio agente parasitando os animais no momento das análises.

No Planalto Norte de Santa Catarina, o rebanho apresentou prevalência de 84,5% para *B. bigemina* pelo teste de Imunofluorescência Indireta (SOUZA et al., 2002). Mais recentemente, utilizando-se a técnica de Multiplex-PCR verificou-se em surto de babesiose e anaplasmosose ocorrido no município de Ponte Alta, no estado de Santa Catarina, onde 63,6% de animais foram positivos para *B. bigemina* (CANEVER et al., 2014). Outro estudo avaliou a prevalência dos agentes do Complexo Tristeza Parasitária e verificou que 16,73% do rebanho foi positivo para *B. bigemina* pela mesma técnica de Multiplex-PCR, sendo que estes índices representam situação de instabilidade enzoótica para a babesiose nos rebanhos da região, fazendo-se necessário o controle dos vetores (VIEIRA, 2014). Os resultados deste estudo com a raça Crioula Lageana corroboram com os achados da região e reafirmam a condição de instabilidade enzoótica de acordo com o preconizado por Mahoney (1975), no entanto, os rebanhos da raça não apresentaram surtos ou mortes isoladas em decorrência da doença, sendo este dado observado pelos proprietários dos rebanhos.

Os machos da raça Crioula Lageana, incluindo-se touros e bezerros, mostraram-se mais suscetíveis à infecção em comparação às fêmeas ($p<0,001$). Vários estudos demonstraram que

machos são mais sensíveis à infecção por diversos protozoários (KAMIS; IBRAHIM, 1989; PRADO JR et al., 1999; CERNETICH et al., 2006). Em estudo com a infecção por *B. microti* em ratos, Sasaki et al. (2013), encontraram maior suscetibilidade à infecção nos machos e atribuíram esse resultado à testosterona, sugerindo que o hormônio masculino é capaz de reduzir a imunidade inata nos ratos infectados. Da mesma forma, Fereig et al. (2017), atribuíram as maiores taxas de infecção por *B. bovis* nos machos devido ao efeito da testosterona em bovinos. Estes dados ajudam a sustentar a hipótese de que a maior taxa de infecção por *B. bigemina* em machos da raça Crioula Lageana esteja relacionada à testosterona e consequente redução da imunidade inata. Porém, mais estudos para a confirmação deste dado são necessários.

Touros e bezerros (machos e fêmeas) apresentaram maior chance de aquisição da infecção por *B. bigemina* quando comparados às vacas e novilhas. Mais uma vez, o fator sexual pode estar atrelado à este dado, da mesma forma que a idade pode influenciar o comportamento da infecção. Animais mais velhos tendem a ser mais facilmente infectados pelos agentes causadores da babesiose nos bovinos (ZINTL et al., 2005). A literatura cita que bezerros possuem forte imunidade inata contra a doença clínica causada por *B. bovis* (TRUEMAN; BLIGHT, 1978; GOFF et al., 2001), no presente estudo, nenhum dos bezerros apresentou a forma clínica da doença, no entanto, a chance de contrair a infecção pelo agente foi maior para os bezerros quando comparados às vacas e novilhas. A possibilidade, uma vez que a doença clínica não se apresentou em nenhuma das categorias animais, é de que as raças bovinas resistentes ao vetor, como a raça Crioula Lageana (CARDOSO et al., 2014), acabem tendo menores taxas de inoculação do agente. Este processo é comum nas raças nativas, devido à adaptação natural (SOLORIO-RIVERA; RODRÍGUEZ-VIVAS, 1997). Dessa maneira, a elevada chance dos bezerros adquirirem o hemoparasito, pode dever-se à falhas no processo de transferência de imunidade nestes animais. Uma vez constatado que estes rebanhos encontram-se em situação de instabilidade enzoótica para *B. bigemina*, possivelmente algumas vacas que não tem contato constante com o agente não estão consequentemente transferindo anticorpos de maneira adequada por meio do colostro para suas crias.

A presença de carapatos parasitando os animais é considerada como fator que predispõe à infecção. Silva et al. (2014), determinaram a infestação por carapatos como fator de risco para a babesiose. As teleóginas são a única forma de desenvolvimento do carapato capaz de se infectar com *B. bigemina*, para posteriormente realizar a transmissão do protozoário para seus ovos (RIEK, 1964; MEHLHORN; SCHEIN, 1984), no entanto, a transmissão para o hospedeiro vertebrado se dá por meio de ninfas, fêmeas adultas e machos (SOLORIO-RIVERA; RODRÍGUEZ-VIVAS, 1997). Não foi realizada nos animais da raça Crioula Lageana

contagem precisa de carapatos e de quais fases de desenvolvimento estavam presentes parasitando os animais.

Dentre os fatores associados à infecção, o contato dos bovinos com outras espécies ($p=0,037$) pode elevar em 1,570 vezes a chance de aquisição do protozoário *B. bigemina*. O carapato *Rhipicephalus microplus* pode interagir com outras espécies não ruminantes e dessa maneira pode ocorrer a introdução de populações de carapatos resistentes à tratamentos (SOLORIO-RIVERA; RODRÍGUEZ-VIVAS, 1997). Esse contato pode tornar-se fonte de infestação por carapatos para os bovinos e dessa forma levar a incremento do número de carapatos na população bovina e consequentemente de maior chance de infecção por *Babesia* spp.

A assistência veterinária desempenha papel contrário ao esperado para o controle da babesiose por *B. bigemina*. As propriedades que não possuem visitas regulares do profissional possuem maior número de animais negativos do que aquelas que recebem a consultoria. Lilenbaum (2003), associou a presença regular do médico veterinário com menores taxas de soropositividade para *Leptospira* spp. em rebanhos no Rio de Janeiro. Neste estudo, a presença regular do veterinário demonstrou aumentar as chances de infecção. Este fato pode estar associado à falta de aplicação de medidas de controle sugeridas pelo profissional ou à aplicação errada das medidas, levando a um controle ineficiente da enfermidade. No entanto, novos estudos são necessários para a verificação do motivo da associação entre a presença do veterinário e a maior chance de ocorrência de infecção no rebanho.

7.5 CONCLUSÃO

O presente estudo revelou prevalência abaixo do limite de estabilidade enzoótica para a infecção por *Babesia bigemina* pela técnica de PCR em bovinos da raça Crioula Lageana. Verificou-se haver influência do sexo nas taxas de infecção. Com relação à categoria dos animais, touros e bezerros apresentaram a maior propensão à infecção quando comparados às vacas e novilhas. Os principais fatores de risco associados à presença ou ausência de infecção foram o contato com outras espécies animais, como a equina, felina, canina e a ovina e espécies de aves e a regularidade da assistência veterinária.

7.6 REFERÊNCIAS

AGUIRRE, D.H. et al. Infección natural con *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en bovinos de raza Hereford, Criolla y Nelore en Tucumán, Argentina. **Revista de Medicina Veterinaria**, v.71, p. 54-60, 1990.

BILHASSI, T.B. et al. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 234-238, 2014.

BOCK, R.E. et al. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 5, p. 337-340, 1997.

BOCK, R.E.; KINGSTON, T.G.; VOS, A.J. de. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 7, p. 461-464, 1999.

BOCK, R.E. et al. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S247-S269, 2004.

BULING, A. et al. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1, p. 16-25, 2007.

CANEVER, M.F. et al. First evaluation of an outbreak of bovine babesiosis and anaplasmosis in Southern Brazil using multiplex PCR. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 52, n. 5, p. 507, 2014.

CARDOSO, C. P. et al. Resistance against gastrointestinal nematodes in Crioulo Lageano and crossbred Angus cattle in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 183-191, 2013.

CARDOSO, C.P. et al. Resistance against ectoparasites in Crioulo Lageano and crossbred Angus cattle in southern Brazil under natural conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 141-146, 2014.

CERNETICH, A. et al. Involvement of gonadal steroids and gamma interferon in sex differences in response to blood-stage malaria infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3190-3203, 2006.

ELIAS, F. et al. Levantamento sorológico dos agentes da tristeza parasitária em bovinos de leite na região Sudoeste do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 102-103, 2016.

FEREIG, R.M. et al. Seroprevalence of *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Trypanosoma evansi*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle in southern Egypt. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 125-131, 2017.

FIGUEROA, J.V. et al. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 1-2, p. 69-81, 1993.

FIGUEROA, J.V. et al. Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 849, n. 1, p. 1-10, 1998.

FINO, T.C.M. et al. Occurrence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in crioula lageana cattle. **Journal of Animal Science Advances**, v. 3, n. 4, p. 165-170, 2013.

GOFF, W.L. et al. The age-related immunity in cattle to *Babesia bovis* infection involves the rapid induction of interleukin-12, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase mRNA expression in the spleen. **Parasite Immunology**, v. 23, n. 9, p. 463-471, 2001.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 109-119, 1995.

JONSSON, N.N.; BOCK, R.E.; JORGENSEN, W.K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1, p. 1-9, 2008.

KAMIS, A.B.; IBRAHIM, J.B. Effects of testosterone on blood leukocytes in *Plasmodium berghei*-infected mice. **Parasitology Research**, v. 75, n. 8, p. 611-613, 1989.

LILENBAUM, W.; SOUZA, G.N. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 75, n. 3, p. 249-251, 2003.

MAHONEY, D.F. The diagnosis of babesiosis in Australia. In: Wells, E.A. (Ed.), Workshop on Hemoparasites (Anaplasmosis and Babesiosis). **CIAT**, p. 49-62, 1975.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. The piroplasms: life cycle and sexual stages. **Advances in Parasitology**, v. 23, p. 37-103, 1984.

OLIVEIRA-SEQUERA, T.C.G. et al. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 1, p. 105-111, 2005.

OPAS (Organización Panamericana de la Salud). **Bioestatística**: procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, n.18, 1979.

PIPER, E.K. et al. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 4, p. 431-441, 2010.

PRADO JR, J.C. et al. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 85, n. 10, p. 826-829, 1999.

RIEK, R.F. The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 15, n. 5, p. 802-821, 1964.

SASAKI, M. et al. Effect of sex steroids on *Babesia microti* infection in mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 2, p. 367-375, 2013.

SILVA, J.B. da; SANTOS, P.N. dos; FONSECA, A.H. Molecular and serological detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in the Rio de Janeiro, Brazil. **Semina-Ciências Agrárias**, p. 3139-3145, 2014.

SOUZA, A.P. et al. Prevalência de anticorpos anti-*Babesia* em bovinos no Planalto Norte de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 1, n. 1, p. 21-23, 2002.

SOLORIO-RIVERA, J.L.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I. Epidemiología de la babesiosis bovina. I. Componentes Epidemiológicos. **Revista Biomédica**, v. 8, n. 1, p. 37-47, 1997.

TRUEMAN, K.F.; BLIGHT, G.W. The effect of age on resistance of cattle to *Babesia bovis*. **Australian Veterinary Journal**, v. 54, n. 6, p. 301-305, 1978.

VIEIRA, L.L. Prevalência e dinâmica de infecções por *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos na região serrana de Santa Catarina. 2014.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina, 2014. 83p.

ZINTL, A. et al. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. **Parasite Immunology**, v. 27, n. 4, p. 115-120, 2005.

8 ALTERAÇÕES CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA NATURALMENTE INFECTADOS POR *ANAPLASMA MARGINALE*

Resumo

A anaplasmose bovina é causadora de grandes prejuízos para a pecuária em função das altas taxas de morbidade e mortalidade. Na raça Crioula Lageana, não existem estudos que associem as variáveis clínicas e hematológicas à presença da infecção. O trabalho tem objetivo de fornecer dados iniciais sobre os aspectos clínicos e hematológicos relacionados à infecção por *A. marginale* em bovinos da raça Crioula Lageana, visando novos estudos acerca da sanidade e tolerância à doenças nesta população. Foram colhidas amostras de sangue de 311 bovinos da raça Crioula Lageana, sendo submetidas à extração de DNA e à PCR com primers específicos para a detecção do agente da anaplasmose bovina. Realizou-se o exame físico aferindo-se a frequência cardíaca, frequência respiratória, movimentos ruminais, temperatura e coloração de mucosas. O hemograma de todos os animais foi realizado, bem como a determinação da concentração de proteína total plasmática e do fibrinogênio plasmático. A presença da infecção não determinou diferenças significativas nas variáveis do exame clínico entre os animais positivos e negativos para a infecção. O volume globular (VG), volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina (Hb), bem como o número de neutrófilos segmentados apresentaram diferenças significativas entre os grupos, porém estavam dentro dos valores de referência para a espécie bovina. Conclui-se que os bovinos da raça Crioula Lageana infectados naturalmente por *A. marginale* não apresentam alterações nas variáveis clínicas e hematológicas que possam ser justificadas pela presença do hemoparasito nos animais.

Palavras-chave: Hematologia. Raça nativa. Anaplasmose.

8.1 INTRODUÇÃO

A anaplasmosse é uma enfermidade geradora de impactos econômicos negativos na bovinocultura mundial (BROWN, 1997). Os custos gerados com a morbidade e a mortalidade de animais reforçam a importância de diagnósticos rápidos e controle adequado da doença.

Neste contexto, a avaliação hematológica eficiente pode contribuir para adequada avaliação da evolução da anaplasmosse, uma vez que o único local conhecido de replicação do agente são os eritrócitos (KOCAN, 2004), direcionando o diagnóstico e prognóstico, e orientando a melhor conduta terapêutica (JAIN, 1993).

No entanto, vários são os fatores capazes de influenciar o hemograma, além de fatores individuais, ambientais e de manejo, a raça também determina variações que devem ser levadas em conta na avaliação do resultado de exames laboratoriais (BIRGEL JÚNIOR et al., 2001).

Não existem trabalhos relacionando as variáveis do hemograma à infecção por *Anaplasma marginale* em bovinos da raça Crioula Lageana, de forma que são desconhecidas as alterações que o agente pode causar na avaliação hematológica. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar e comparar as variáveis do hemograma, as concentrações de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático de animais da raça Crioula Lageana naturalmente infectados ou não por *A. marginale*.

8.2 MATERIAIS E MÉTODOS

8.2.1 Animais e obtenção das amostras

Foram colhidas amostras de sangue de 311 bovinos da raça Crioula Lageana, machos e fêmeas, jovens e adultos, todos registrados na Associação Brasileira de Criadores da Raça Crioula Lageana (ABCCL), oriundos de propriedades núcleos de conservação *in situ*, localizadas no Planalto Catarinense. Para tal, foram utilizados tubos de coleta à vácuo com anticoagulante EDTA a 10% para realização do hemograma e demais análises hematológicas. Após a colheita, as amostras foram congeladas a -20°C até a extração do DNA.

8.2.2 Exame Físico

O exame físico foi empregado para a verificação de sinais clínicos compatíveis com a doença clínica, onde se aferiu a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), movimentos ruminais (MR), temperatura retal e coloração das mucosas.

8.2.3 Avaliação hematológica

Para as contagens de eritrócitos e leucócitos totais, bem como para a determinação do volume globular e da concentração de hemoglobina, além dos índices hematimétricos absolutos de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) utilizou-se contador automático de células (SDH3 Labtest). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio da análise microscópica de esfregaços sanguíneos corados com corantes do tipo Romanowsky (Panótico Rápido) (JAIN, 1993). A concentração da proteína total plasmática (PTP) foi determinada por refratometria (ATAGO) e a concentração do fibrinogênio plasmático pelo método de precipitação pelo calor seguida por leitura em refratômetro (JAIN, 1993).

8.2.4 Extração de DNA e análise molecular

As amostras de sangue, foram submetidas à extração de DNA por meio de kit comercial ReliaPrepTM Blood gDNA Miniprep System (PROMEGA[®]), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, a concentração de cada amostra de DNA foi mensurada por meio de espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific[®]) e diluído para manter-se à concentração mínima de 20ng/ μ L.

Para a amplificação do DNA de *A. marginale* utilizou-se o primer baseado no gene MSP5 (MSP5 F: 5' - CGC AGA TCT AGC AAA ATC GGC GAG AGG TTT ACC ACT TC- 3' e MSP5 R: 5' - GCG CTG CAG TGG CGC AAA ATG CCC GAC ATA CC- 3'), o qual amplifica um fragmento de 458pb para o agente.

A reação de PCR deu-se em microtubos de 0,2mL, onde adicionou-se um volume final de 25 μ L de solução, contendo 1U de enzima *Taq* Polimerase GoTaq[®] Hot Start Polymerase, (Promega); 8,5 pmoles de cada primer; 0,2mM de nucleotídeos (dNTPs); 3,5mM de cloreto de magnésio; 5 μ L de tampão 5X Green GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega); 3 μ L de DNA (concentração entre 20 e 100ng/ μ L) e água ultra pura para completar o volume final e ajustar a concentração dos reagentes. Foram utilizados controles positivos e negativos a cada reação, sendo que este último foi utilizado para garantir a qualidade e especificidade da técnica,

abordando os mesmos parâmetros citados anteriormente, substituindo apenas o uso de DNA genômico por água ultra pura, livre de DNase. As condições de temperatura aplicadas no termociclador (Biocycler) envolveram a desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54,2°C por 1 minuto e 73°C por 1 minuto, e ainda uma extensão final a 73°C por 7 minutos.

A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 2% acrescido do corante Unisafe Dye (Uniscience). Na primeira lacuna do gel utilizou-se marcador de peso molecular de 100pb como padrão para determinar o tamanho das bandas das amostras. As condições da fonte elétrica foram de 140 Volts e 400mA por 01h00min, e visualização mediante exposição à luz ultravioleta. Bandas com tamanho próximo a 458pb foram consideradas positivas para *A. marginale*.

8.2.5 Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade. Para a comparação das médias das variáveis, tanto clínicas quanto hematológicas, entre animais positivos e negativos utilizou-se o teste t para dados considerados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para os não-paramétricos. Para todos os testes admitiu-se probabilidade de erro de 5%.

8.2.6 Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob número de protocolo 2461171115.

8.3 RESULTADOS

8.3.1 Exame clínico

Dos 311 animais da raça Crioula Lageana avaliados, 248 apresentaram-se positivos para a infecção por *A. marginale* pela técnica de PCR. Nenhuma das variáveis avaliadas no exame clínico apresentou diferenças significativas entre animais positivos e negativos. A média das frequências cardíacas dos dois grupos ultrapassou o limite máximo do valor de referência para a espécie bovina, sem diferir significativamente (dados não apresentados).

8.3.2 Avaliação hematológica

De todas as variáveis hematológicas avaliadas, o VG, o VGM e a concentração de hemoglobina apresentaram diferenças significativas entre animais positivos e negativos para a infecção por *A. marginale* (Tabela 7). No leucograma, apenas os neutrófilos segmentados apresentaram diferenças significativas na comparação entre positivos e negativos (Tabela 7).

Tabela 7 - Médias e desvios-padrão dos valores do hemograma, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático de 311 animais da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *A. marginale*.

Variáveis	Negativos	Positivos	p
Eritróцитos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	$7,89 \pm 1,75$	$8,02 \pm 1,41$	0,267
Hb (g/dL)	$12,19 \pm 2,07$	$12,93 \pm 1,68$	0,015*
VG (%)	$36 \pm 5,88$	$38 \pm 4,98$	0,018*
VGM (fL)	$46,31 \pm 6,51$	$48,09 \pm 7,38$	0,047*
CHGM (%)	$34,02 \pm 1,07$	$34,33 \pm 3,52$	0,362
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$396 \pm 210,96$	$372 \pm 178,78$	0,476
Leucócitos totais (/μL)	$11604 \pm 3520,79$	$13036 \pm 5404,37$	0,178
Bastonetes (/μL)	$23 \pm 61,85$	$29 \pm 87,53$	0,594
Segmentados (/μL)	$2516 \pm 1560,97$	$3674 \pm 2800,21$	<0,001*
Linfócitos (/μL)	$8036 \pm 2986,43$	$8154 \pm 3691,19$	0,656
Eosinófilos (/μL)	$629 \pm 696,74$	$733 \pm 701,77$	0,089
Basófilos (/μL)	$9 \pm 45,16$	$10 \pm 39,25$	0,354
Monócitos (/μL)	$392 \pm 289,61$	$437 \pm 433,32$	0,958
PTP	$7,27 \pm 0,80$	$7,46 \pm 0,70$	0,133
Fibrinogênio	$405 \pm 211,31$	$383 \pm 217,10$	0,333

* Indica diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: elaborado pela autora, 2017.

8.4 DISCUSSÃO

Os animais da raça Crioula Lageana encontram-se em situação de estabilidade enzoótica (MAHONEY, 1975) para a anaplasmosse. Dos 311 animais avaliados, todos estavam clinicamente sadios, sem sinais clínicos compatíveis com a anaplasmosse ou outras enfermidades. Quando acometidos pela doença, espera-se que os bovinos apresentem febre, mucosas pálidas, icterícia, letargia, depressão, perda de apetite, perda de peso e redução na produção de leite, como verificado por Coşçun et al. (2012) em bovinos leiteiros naturalmente

infetados por *A. marginale*. A ausência de animais apresentando a doença clínica nos rebanhos da raça Crioula Lageana não permitiu a comparação das variáveis clínicas entre animais positivos para *A. marginale* doentes ou não. Todos os animais infectados pelo hemoparasito eram subclínicos, e todos os parâmetros aferidos confirmaram a condição.

A ocorrência de surtos da doença permitiria uma comparação mais apurada das variáveis clínicas e hematológicas entre animais saudáveis e doentes, sendo possível observar diferenças significativas entre os animais que desenvolvessem a forma aguda da doença com aqueles que se tornaram subclínicos. A redução do VG e a elevação da temperatura são os achados mais comuns nos animais acometidos pela anaplasmosse aguda e podem ser considerados dados auxiliares para o diagnóstico da doença em casos de surtos (EL-ASHKER et al., 2015). Para a população da raça Crioula Lageana, no entanto, a ocorrência de surtos nunca foi reportada pelos proprietários. Apesar de um surto recente de babesiose e anaplasmosse ter ocorrido no município de Ponte Alta, no estado de Santa Catarina (CANEVER et al., 2014), local onde existem propriedades de conservação da raça Crioula Lageana, para os animais da raça não houve relatos de problemas com o rebanho.

Dentro das variáveis hematológicas analisadas, não foram encontradas evidências de alterações relativas à infecção por *A. marginale*, contrariamente ao resultado da infecção natural pelo agente em bovinos leiteiros, que evidenciou redução na contagem de eritrócitos, diminuição do VG e também da Hb em 40 vacas clinicamente doentes (COŞCUN et al., 2012). Abdela et al. (2017) também encontraram diferenças significativas para o VG de animais positivos e negativos para *A. marginale*, oposto do encontrado neste trabalho. Estes autores, no entanto, avaliaram a positividade por meio de esfregaços sanguíneos em animais que apresentavam a doença clínica, enquanto no presente trabalho todos os animais eram subclínicos e foram considerados positivos por meio de PCR, a qual apresenta alta sensibilidade. Os resultados de VG e Hb nos animais positivos para *A. marginale* foram superiores aos dos animais negativos, demonstrando que a infecção subclínica pelo agente da anaplasmosse não altera estas variáveis como se esperaria em função de sua replicação nos eritrócitos. Essa diferença encontrada é inespecífica e nenhuma explicação para tal foi encontrada na literatura, da mesma forma que o aumento no número de neutrófilos segmentados não pode ser associado exclusivamente com a infecção por *A. marginale*.

Raças zebuínas e mestiças são reportadas como menos suscetíveis à infecção por *A. marginale* (BOCK et al., 1999), mantendo-se subclínicas, enquanto a linhagem de animais taurinos é colocada como mais suscetível à enfermidade, apresentando sinais mais aparentes. A raça Crioula Lageana é oriunda de animais ibéricos que foram trazidos ao Brasil e aqui sofreu

seleção natural, o que tornou esta raça muito adaptada (MARIANTE; CAVALCANTE, 2000). Os resultados obtidos na avaliação clínica e hematológica dos animais infectados por *A. marginale* podem levantar a hipótese de que a infecção não desencadeia a doença clínica, levantando-se assim a hipótese de que a resistência observada nos animais zebuíños e suas cruzas também pode se aplicar a raça Crioula Lageana, apesar de oriunda de animais *Bos taurus*.

Novos estudos poderiam ainda determinar que a resistência à *A. marginale* pode estar mais associada à raça do que somente às linhagens bovinas. A presença de alelos mutantes que possam conferir tolerância às hemoparasitoses (DUANGJINDA et al., 2013), também é uma ferramenta que pode auxiliar na determinação de raças resistentes. As variações genéticas do hemoparasito são um fator capaz de influenciar a resposta dos bovinos à infecção, de forma que a detecção destas variações poderia auxiliar a avaliação da resistência dos animais à enfermidade.

8.5 CONCLUSÃO

Conclui-se que os bovinos da raça Crioula Lageana infectados por *A. marginale* não apresentam alterações nas variáveis clínicas e hematológicas que possam ser justificadas pela presença do hemoparasito nos animais.

8.6 REFERÊNCIAS

ABDELA, N.; IBRAHIM, N.; BEGNA, F. Prevalence, risk factors and vectors identification of bovine anaplasmosis and babesiosis in and around Jimma Town, Southwestern Ethiopia. *Acta Tropica*, 2017. No prelo.

BIRGEL JUNIOR E.H. et al. Valores de referência do leucograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.38, n.3, p. 136-141, 2001.

BOCK, R. E.; KINGSTON, T. G.; VOS, AJ de. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Anaplasma marginale* transmitted by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 11, p. 748-751, 1999.

BROWN, C.G. Dynamics and impact of tick-borne diseases of cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 29, n. 4 Suppl, p. 1S-3S, 1997.

CANEVER, M.F. et al. First evaluation of an outbreak of bovine babesiosis and anaplasmosis in Southern Brazil using multiplex PCR. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 52, n. 5, p. 507, 2014.

COŞCUN, A. et al. Acute phase proteins, clinical, hematological and biochemical parameters in dairy cows naturally infected with *Anaplasma marginale*. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 18, n. 3, p. 497-502, 2012.

DUANGJINDA, M. et al. Association of BoLA-DRB3 alleles with tick-borne disease tolerance in dairy cattle in a tropical environment. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3, p. 314-320, 2013.

EL-ASHKER, M. et al. Molecular biological identification of *Babesia*, *Theileria*, and *Anaplasma* species in cattle in Egypt using PCR assays, gene sequence analysis and a novel DNA microarray. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 3, p. 329-334, 2015.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

KOCAN, K.M. et al. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S285-S300, 2004.

MAHONEY, D.F. The diagnosis of babesiosis in Australia. In: Wells, E.A. (Ed.), Workshop on Hemoparasites (Anaplasmosis and Babesiosis). CIAT, p. 49-62, 1975.

MARIANTE, A.S.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2000. 232p.

9 ALTERAÇÕES CLÍNICAS E HEMATOLÓGICAS EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA NATURALMENTE INFECTADOS POR *BABESIA BOVIS* E *BABESIA BIGEMINA*

Resumo

A babesiose bovina, causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* é causadora de grandes prejuízos para a pecuária em função das altas taxas de morbidade e mortalidade. Na raça Criola Lageana, não existem estudos que associem as variáveis clínicas e hematológicas à presença da infecção por estes agentes. O trabalho tem objetivo de apresentar dados iniciais sobre os aspectos clínicos e hematológicos relacionados à infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* em bovinos da raça Criola Lageana, visando novos estudos acerca da sanidade e tolerância à doenças nesta população. Foram colhidas amostras de sangue de 311 bovinos da raça Criola Lageana, sendo submetidas à extração de DNA e à PCR com primers específicos para a detecção dos agentes da babesiose bovina. Realizou-se o exame físico aferindo-se a frequência cardíaca, frequência respiratória, movimentos ruminais, temperatura e coloração de mucosas. O hemograma de todos os animais foi realizado, bem como a determinação da concentração de proteína total plasmática e do fibrinogênio plasmático. A presença da infecção não determinou diferenças significativas nas variáveis do exame clínico para os animais positivos e negativos para a infecção. O volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina globular média (CHGM) para *B. bigemina* e a concentração de hemoglobina para *B. bovis*, bem como o número leucócitos totais e linfócitos para os dois agentes apresentaram diferenças significativa entre os grupos, porém os valores do eritrograma estavam dentro dos valores de referência para a espécie bovina. Conclui-se que os bovinos da raça Criola Lageana infectados por *B. bovis* e *B. bigemina* não apresentam alterações nas variáveis clínicas e hematológicas que possam ser justificadas pela presença do hemoparasito nos animais.

Palavras-chave: Hematologia. Raça nativa. Babesiose.

9.1 INTRODUÇÃO

A babesiose é causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e seu único vetor é o carapato *Rhipicephalus microplus* (GUGLIELMONE, 1995). Possui grande importância econômica devido às perdas causadas pela queda de produtividade, custos com controle, tratamento e mortalidade de animais, além de influenciar o comércio internacional de bovinos (BOCK et al., 2004).

Neste contexto, a avaliação hematológica eficiente pode contribuir para adequada avaliação da evolução da babesiose, direcionando o diagnóstico e prognóstico, orientando a melhor conduta terapêutica (JAIN, 1993).

No entanto, vários são os fatores capazes de influenciar o hemograma, além de fatores individuais, ambientais e de manejo, a raça também determina variações que devem ser levadas em conta na avaliação do resultado de exames laboratoriais (BIRGEL JÚNIOR et al., 2001).

Não existem trabalhos relacionando as variáveis do hemograma à infecção por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* em bovinos da raça Crioula Lageana, de forma que são desconhecidas as alterações que o agente pode causar na avaliação hematológica desses animais. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar e comparar as variáveis do hemograma, as concentrações de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático de animais da raça Crioula Lageana naturalmente infectados ou não por *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*.

9.2 MATERIAIS E MÉTODOS

9.2.1 Animais e obtenção das amostras

Foram colhidas amostras de sangue de 311 bovinos da raça Crioula Lageana, machos e fêmeas, jovens e adultos, todos registrados na Associação Brasileira de Criadores da Raça Crioula Lageana (ABCCL), oriundos de propriedades núcleos de conservação *in situ*, localizadas no Planalto Catarinense. Para tal, foram utilizados tubos de coleta à vácuo com anticoagulante EDTA a 10% para realização do hemograma e demais análises hematológicas. Após a colheita, as amostras foram congeladas a -20°C até a extração do DNA.

9.2.2 Exame Físico

O exame físico foi empregado para a verificação de sinais clínicos compatíveis com a doença clínica, onde se aferiu a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), movimentos ruminais (MR), temperatura retal e coloração das mucosas.

9.2.3 Avaliação hematológica

Para as contagens de eritrócitos e leucócitos totais, bem como para a determinação do volume globular (VG), da concentração de hemoglobina, além dos índices hematimétricos absolutos de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) utilizou-se contador automático de células (SDH3 Labstest). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio da análise microscópica de esfregaços sanguíneos corados com corantes do tipo Romanowsky (Panótico Rápido) (JAIN, 1993). A concentração da proteína total plasmática (PTP) foi determinada por refratometria (ATAGO) e a concentração do fibrinogênio plasmático pelo método de precipitação pelo calor seguida por leitura em refratômetro (JAIN, 1993).

9.2.4 Extração de DNA e análise molecular

As amostras de sangue, foram submetidas à extração de DNA por meio de kit comercial ReliaPrepTM Blood gDNA Miniprep System (PROMEGA[®]), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, a concentração de cada amostra de DNA foi mensurada por meio de espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific[®]) e diluído para manter-se à concentração mínima de 20ng/ μ L.

As técnicas de PCR e nested-PCR (n-PCR) foram usadas para a amplificação do DNA de *B. bovis* e *B. bigemina*. Os conjuntos de primers usados nas reações são os descritos por Figueroa et al. (1993). Todas as amostras de DNA foram submetidas às duas reações.

A reação de PCR para cada agente deu-se em microtubos de 0,2mL, onde se adicionou um volume final de 25 μ L de solução, contendo 1U de enzima *Taq* Polimerase GoTaq[®] Hot Start Polymerase, (Promega); 8,5 pmoles de cada primer primer (BoF: 5'-CAC GAG GAA GGA ACT ACC GAT GTT GA-3' e BoR: 5'- CCA AGG AGC TTC AAC GTA CGA GGT CA-3'), 0,2mM de nucleotídeos (dNTPs); 3,5mM de cloreto de magnésio; 5 μ L de tampão 5X Green GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega); 3 μ L de DNA (concentração entre 20 e 100ng/ μ L) e água ultra pura para completar o volume final e ajustar a concentração dos reagentes. Foram utilizados controles positivos e negativos a cada reação, sendo que este último foi utilizado para

garantir a qualidade e especificidade da técnica, abordando os mesmos parâmetros citados anteriormente, substituindo apenas o uso de DNA genômico por água ultra pura, livre de DNase. O mesmo mix de reação foi usado para a n-PCR, substituindo-se apenas o DNA dos animais por 2 µL do produto da primeira PCR, e os primers utilizados pelos específicos para a n- PCR de acordo com Figueroa et al. (1993).

As condições de temperatura aplicadas no termociclador (Biocycler®) para as duas reações envolveram a desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54,2°C por 1 minuto e 73°C por 1 minuto, e ainda uma extensão final a 73°C por 7 minutos.

A eletroforese dos produtos de amplificação foi realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 2% acrescido do corante Unisafe Dye (Uniscience). Na primeira lacuna do gel utilizou-se marcador de peso molecular de 100pb como padrão para determinar o tamanho das bandas das amostras. As condições da fonte elétrica foram de 140 Volts e 400mA por 01h00min, e visualização mediante exposição à luz ultravioleta. Bandas com tamanho próximo a 350pb e 278pb foram consideradas positivas para *B. bovis* e *B. bigemina* respectivamente na primeira reação e bandas com tamanho aproximado de 290pb e 170pb foram consideradas positivas na segunda reação.

9.2.5 Análise Estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade. Para a comparação das médias das variáveis, tanto clínicas quanto hematológicas, entre animais positivos e negativos utilizou-se o teste t para dados considerados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para os não-paramétricos. Para todos os testes admitiu-se probabilidade de erro de 5%.

9.2.6 Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) sob número de protocolo 2461171115.

9.3 RESULTADOS

9.3.1 Exame clínico

Dos 311 animais da raça Crioula Lageana avaliados, 224 apresentaram-se positivos para a infecção por *B. bovis* e 186 para a infecção por *B. bigemina* pela técnica de PCR. Nenhuma das variáveis avaliadas no exame clínico apresentou diferenças significativas entre animais positivos e negativos. Apenas o número de movimentos ruminais diferiu entre animais positivos e negativos para *B. bigemina*. (dados não apresentados).

9.3.2 Avaliação hematológica

De todas as variáveis hematológicas avaliadas, a concentração de hemoglobina e o número de leucócitos totais e linfócitos apresentaram diferença significativa na comparação entre animais positivos e negativos para a infecção por *B. bovis* (Tabela 8).

O VGM e o CHGM apresentaram diferenças significativas entre animais positivos e negativos para a infecção por *B. bigemina* (Tabela 9). No leucograma, leucócitos totais, linfócitos e eosinófilos apresentaram diferenças significativas na comparação entre positivos e negativos para *B. bigemina* (Tabela 9).

Tabela 8 - Médias e desvios-padrão dos valores do hemograma, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático de 311 animais da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *Babesia bovis*.

Variáveis	Negativos	Positivos	p
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	$7,79 \pm 1,46$	$8,07 \pm 1,48$	0,265
Hb (g/dL)	$12,45 \pm 1,94$	$12,91 \pm 1,71$	0,041**
VG (%)	$36,46 \pm 5,34$	$37,38 \pm 5,14$	0,056
VGM (fL)	$47,59 \pm 6,76$	$47,79 \pm 7,42$	0,568
CHGM (%)	$34,11 \pm 1,15$	$34,33 \pm 3,68$	0,729
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$363,55 \pm 162,53$	$381,65 \pm 193,98$	0,792
Leucócitos totais (/μL)	$11339,14 \pm 4890,38$	$13292,77 \pm 5095,44$	<0,001*
Basófagos (/μL)	$32,41 \pm 102,09$	$26,27 \pm 74,34$	0,871
Segmentados (/μL)	$2979,83 \pm 2038$	$3617,24 \pm 2819,35$	0,059
Linfócitos (/μL)	$7145,69 \pm 3229,07$	$8512 \pm 3609,49$	<0,001*
Eosinófilos (/μL)	$735,53 \pm 689,19$	$702,70 \pm 706,72$	0,489
Basófilos (/μL)	$15,68 \pm 55,28$	$7,77 \pm 32,75$	0,126
Monócitos (/μL)	$430,30 \pm 419,17$	$426,78 \pm 404,94$	0,872
PTP	$7,37 \pm 0,76$	$7,44 \pm 0,71$	0,470
Fibrinogênio	$389,87 \pm 202,29$	$397,32 \pm 217,59$	0,768

**Indica diferença significativa entre os grupos pelo teste t. * Indica diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: elaborado pela autora, 2017.

Tabela 9 - Médias e desvios-padrão dos valores do hemograma, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático de 311 animais da raça Crioula Lageana, negativos e positivos para a infecção natural por *Babesia bigemina*.

Variáveis	Negativos	Positivos	p
Eritróцитos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	$7,81 \pm 1,48$	$8,11 \pm 1,47$	0,126
Hb (g/dL)	$12,82 \pm 1,79$	$12,75 \pm 1,78$	0,734
VG (%)	$37,32 \pm 4,98$	$37,47 \pm 5,39$	0,645
VGM (fL)	$48,85 \pm 7,41$	$46,98 \pm 7,03$	0,042*
CHGM (%)	$34,35 \pm 1,20$	$34,21 \pm 4,00$	0,004*
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$356,68 \pm 161,15$	$389,97 \pm 199,74$	0,303
Leucócitos totais (/μL)	$11737,60 \pm 4737,22$	$13424,11 \pm 5245,56$	0,003*
Bastonetes (/μL)	$28,54 \pm 75,12$	$27,61 \pm 87,96$	0,397
Segmentados (/μL)	$3406,28 \pm 2471,33$	$3460,87 \pm 2748,64$	0,834
Linfócitos (/μL)	$7095,56 \pm 3234,86$	$8824,83 \pm 3600,22$	<0,001*
Eosinófilos (/μL)	$787,02 \pm 680,70$	$661,40 \pm 711,53$	0,020*
Basófilos (/μL)	$9,80 \pm 40,14$	$10,11 \pm 40,68$	0,913
Monócitos (/μL)	$410,61 \pm 398,08$	$439,29 \pm 415,69$	0,491
PTP	$7,50 \pm 0,70$	$7,37 \pm 0,74$	0,120
Fibrinogênio	$385,32 \pm 220,61$	$413,98 \pm 204,32$	0,144

* Indica diferença significativa entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: elaborado pela autora, 2017.

9.4 DISCUSSÃO

Os animais da raça Crioula Lageana encontram-se em situação de instabilidade enzoótica (MAHONEY, 1975) para a babesiose. Ainda assim, dos 311 animais avaliados, todos se encontravam clinicamente saudáveis, sem sinais clínicos compatíveis com a babesiose ou outras enfermidades.

Animais clinicamente positivos para a babesiose apresentam sinais como febre, icterícia, hemoglobinúria, fraqueza, taquicardia e perda de peso (SHARMA et al., 2016). A ausência de animais apresentando a doença clínica nos rebanhos da raça Crioula Lageana não permitiu a comparação das variáveis clínicas entre animais positivos para *B. bovis* e *B. bigemina*, doentes ou não. Todos os animais infectados pelos hemoparasitos eram subclínicos, e todos os parâmetros aferidos confirmaram esta condição.

A ocorrência de surtos da doença permitiria a comparação mais apurada das variáveis clínicas e hematológicas entre animais saudáveis e doentes, sendo possível observar diferenças

significativas entre os animais que desenvolvem a forma aguda da doença com aqueles que se tornaram subclínicos. A redução do VG e do número de eritrócitos são achados comuns nos animais afetados pela babesiose. Na infecção natural por *B. bigemina* no Egito, Saleh (2009), observou redução destas variáveis nos animais positivos com a doença clínica em comparação com os negativos. Nos animais naturalmente infectados por *B. bovis* e *B. bigemina* da raça Crioula Lageana, no entanto, nenhuma alteração foi verificada nos grupos de animais positivos e negativos que possam ser relacionadas à infecção. Abdela et al. (2017) também encontraram diferenças significativas para o VG de animais positivos com a doença clínica e negativos para os agentes da babesiose, o que não foi confirmado neste trabalho em função dos animais serem subclínicos.

Para os bovinos deste estudo, foi possível verificar que o maior aumento na contagem de leucócitos e linfócitos se deu entre bezerros, sendo que os valores destas variáveis obtidos nesta categoria elevaram a média total. Esta observação corrobora com Mendonça et al. (2003), no qual observou-se redução na contagem total de leucócitos e linfócitos no quarto dia pós-inoculação, com posterior elevação da contagem destas células, em bezerros infectados experimentalmente. Mas também pode estar relacionada à premunição natural que ocorre nesta faixa etária.

Dentro das variáveis hematológicas analisadas, não foram encontradas evidências de alterações relativas à infecção por *B. bovis* e *B. bigemina*, contrariamente ao resultado da infecção natural pelos agentes em bovinos no Egito, que evidenciou redução na contagem de eritrócitos, diminuição do VG e também da concentração de hemoglobina (MAHMOUD et al., 2015).

Raças zebuínas e mestiças são reportadas como menos suscetíveis à infecção por *B. bovis* e *B. bigemina* (BOCK et al., 1997; BOCK et al., 1999), mantendo-se subclínicas, enquanto a linhagem de animais taurinos é colocada como mais suscetível à enfermidade, apresentando sinais mais aparentes. A raça Crioula Lageana é oriunda de animais ibéricos que foram trazidos ao Brasil e aqui sofreu seleção natural, o que tornou esta raça muito adaptada (MARIANTE; CAVALCANTE, 2000). Os resultados obtidos na avaliação clínica e hematológica dos animais infectados por *B. bovis* e *B. bigemina* podem sugerir que a infecção não desencadeia a doença clínica, levantando-se assim a hipótese de que a resistência observada nos animais zebuínos e suas cruzas também pode se aplicar a raça Crioula Lageana, apesar de oriunda de animais *Bos taurus*.

Novos estudos poderiam ainda determinar que a resistência à *B. bovis* e *B. bigemina* pode estar mais associada à raça do que somente às linhagens bovinas. A presença de genes que

possam conferir tolerância às hemoparasitoses (DUANGJINDA et al., 2013), também é uma ferramenta que pode auxiliar na determinação de raças resistentes. As variações genéticas do hemoparasito são um fator capaz de influenciar a resposta dos bovinos à infecção, de forma que a detecção destas variações poderia auxiliar na avaliação da resistência dos animais à enfermidade.

9.5 CONCLUSÃO

Conclui-se que os bovinos da raça Crioula Lageana infectados por *B. bovis* e *B. bigemina* não apresentam alterações nas variáveis clínicas e hematológicas que possam ser justificadas pela presença do hemoparasito nos animais.

9.6 REFERÊNCIAS

ABDELA, N.; IBRAHIM, N.; BEGNA, F. Prevalence, risk factors and vectors identification of bovine anaplasmosis and babesiosis in and around Jimma Town, Southwestern Ethiopia. **Acta Tropica**, 2017. No prelo.

BIRGEL JUNIOR E.H. et al. Valores de referência do leucograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.38, n.3, p. 136-141, 2001.

BOCK, R.E. et al. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 5, p. 337-340, 1997.

BOCK, R.E.; KINGSTON, T.G.; VOS, A.J. de. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 7, p. 461-464, 1999.

BOCK, R.E. et al. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S247-S269, 2004.

BROWN, C.G. Dynamics and impact of tick-borne diseases of cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 29, n. 4 Suppl, p. 1S-3S, 1997.

DUANGJINDA, M. et al. Association of BoLA-DRB3 alleles with tick-borne disease tolerance in dairy cattle in a tropical environment. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3, p. 314-320, 2013.

FIGUEROA, J. V. et al. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 1-2, p. 69-81, 1993.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 109-119, 1995.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

MAHMOUD, M. S. et al. Serological and molecular diagnostic surveys combined with examining hematological profiles suggests increased levels of infection and hematological response of cattle to babesiosis infections compared to native buffaloes in Egypt. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 319, 2015.

MAHONEY, D.F. The diagnosis of babesiosis in Australia. In: Wells, E.A. (Ed.), Workshop on Hemoparasites (Anaplasmosis and Babesiosis). CIAT, p. 49-62, 1975.

MARIANTE, A.S.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2000. 232p.

MENDONÇA, C. L. de et al. Avaliação clínica e hematológica em bezerros Nelore infectados experimentalmente com isolados de *Babesia bigemina* das regiões Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 52-60, 2003.

SALEH, M.A. Erythrocytic oxidative damage in crossbred cattle naturally infected with *Babesia bigemina*. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 1, p. 43-48, 2009.

SHARMA, A. et al. Clinicopatho-biochemical alterations associated with subclinical babesiosis in dairy animals. **Journal of Arthropod-borne Diseases**, v. 10, n. 2, p. 258, 2016.

10 CONCLUSÃO

A prevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da raça Crioula Lageana, obtida pela técnica de PCR é alta, de modo a colocar os animais em situação de estabilidade enzoótica para a anaplasmosse. O sexo, a categoria e a infestação por carrapatos não influenciam as taxas de infecção. Os principais fatores associados à presença ou ausência de infecção por *A. marginale* são a finalidade produtiva da criação, a regularidade no controle de carrapatos, os acaricidas usados e a categoria mais infestada por carrapatos.

A prevalência de *Babesia bovis* em bovinos da raça Crioula Lageana, obtida pela técnica de PCR é alta, no entanto encontra-se abaixo do limite de estabilidade. Não há influência do sexo nas taxas de infecção, no entanto, com relação à categoria dos animais, as novilhas apresentam a menor propensão à infecção quando comparadas às demais categorias. Os principais fatores de risco associados à presença ou ausência de infecção são a finalidade produtiva da criação, o contato com outras espécies animais, a regularidade do controle de carrapatos e a época de emprego dos tratamentos para os carrapatos e para a babesiose.

A prevalência de *Babesia bigemina* em bovinos da raça Crioula Lageana, obtida pela técnica de PCR é alta, no entanto está abaixo do limite de estabilidade enzoótica para a enfermidade. Há influência do sexo nas taxas de infecção. Com relação à categoria dos animais, touros e bezerros apresentam a maior propensão à infecção quando comparados às vacas e novilhas. Os principais fatores de risco associados à presença ou ausência de infecção são o contato com outras espécies animais e a regularidade da assistência veterinária.

Os bovinos da raça Crioula Lageana infectados por *A. marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* não apresentam alterações nas variáveis clínicas e hematológicas que possam ser justificadas pela presença dos hemoparasitos nos animais sendo considerados subclínico.

ANEXOS

ANEXO A – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO APLICADO AOS PROPRIETÁRIOS DOS REBANHOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA.

QUESTIONÁRIO FATORES ASSOCIADOS À INFECÇÃO POR ANAPLASMA MARGINALE, BABESIA BOVIS E BABESIA BIGEMINA EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA

Nº FICHA: _____ Nº _____

PROPRIEDADE: _____

NOME: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____

1. Número de animais na propriedade

- De 51 a 100
- Mais de 100

2. Finalidade produtiva da criação

- Carne, reprodução e venda
- Carne
- Reprodução e venda
- Carne e venda
- Venda

3. Tamanho da propriedade

- De 50 a 100 ha
- Maior que 100 há

4. Contato dos bovinos com outras espécies animais

- Equino, cão e ovino
- Suíno
- Equino e cão
- Equino, suíno, cão e gato
- Equino, cão, gato, ave e ovino
- Equino, cão, gato e silvestres

5. Contato com bovinos de outras propriedades

- Sim
- Não

6. Reposição de animais

- Próprio rebanho
- Próprio rebanho e outras propriedades

7. Assistência veterinária

- Sim
- Não

8. Casos anteriores de anaplasmosse

- Sim
- Não

9. Casos anteriores de babesiose

- Sim
- Não

10. Período de maior infestação por carrapatos

- Outono
- Verão
- Outono e primavera
- Verão e outono

11. Presença de insetos hematófagos

- Sim
- Não

12. Controle de carrapatos

- Sim
- Não

13. Acaricidas usados

- Piretróides
- Organofosforados e avermectinas
- Avermectinas

14. Época de tratamentos para carrapatos e anaplasmosse

- Outono
- Primavera e outono
- Primavera, verão e outono
- Verão
- Verão e outono

15. Categorias mais parasitadas por carrapatos

- Vaca prenhe, em lactação e bezerro
- Vaca em lactação
- Bezerro

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UDESC



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

**Comitê de Ética em
Experimentação Animal**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Fatores de risco e Prevalência de Tristeza Parasitária em Bovinos da Raça Crioula Lageana", protocolado sob o CETEA nº 2461171115, sob a responsabilidade de **Joandes Henrique Fonteque** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (CETEA/UDESC) em reunião de 05/05/2016.

We certify that the proposal "Risk factors and prevalence of the tick fever and cattle Crioula Lageana breed", utilizing 600 Bovines (males and females); protocol number CETEA 2461171115, under the responsibility of **Joandes Henrique Fonteque** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata; subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the University of the State of Santa Catarina (CETEA/UDESC) in the meeting of 05/05/2016.

Vigência da Proposta: de 03/2016 a 03/2018

Área: Medicina Veterinária

Procedência: Não aplicável

Espécie: Bovinos

Linhagem: Crioula Lageana

Gênero: Machos e Fêmeas

Idade: 1 a 360 meses N: 600

Peso: 50 a 900 kg

Resumo: Serão utilizados 600 bovinos, machos e fêmeas, jovens e adultos da raça Crioula Lageana registrados na Associação Brasileira dos Criadores de Bovinos da Raça Crioula Lageana (ABCCL) provenientes de propriedades nucleos de conservação in situ da raça localizadas nas Fazendas Bom Jesus do Herval e Canoas, no município de Ponte Alta-SC, Igrejinha e Santa Rita do Passo da Teia, Coxilha Rica em Lages-SC, Grande, em Palmeir-SC e da Cadeus, no município de Curiúbas-SC. Serão colhidas amostras de no mínimo de 1% do numero total de animais do rebanho de cada propriedade por meio da venopunção jugular externa em tubos a vácuo com anticoagulante EDTA 10% para a realização do hemograma, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio. Uma amostra da amostra será separada e realizada a extração do DNA por meio do método fenol clorofórmio e realizada a PCR Multiplex para a identificação do DNA dos agentes da Tristeza Parasitária Bovina e estudo de sua prevalência. Para a determinação dos fatores de risco sera realizada a aplicação de um questionário epidemiológico contendo questões sobre aspectos gerais e perfil da propriedade, do produtor e do rebanho, manejo zootécnico e sanitário, e questões relacionadas à TPB aos proprietários de cada propriedade analisada. A análise estatística dos dados será realizada pela análise de regressão logística, modelo linear generalizado, com distribuição binomial para as variáveis idade e sexo dos animais, e análise de variância, para as variáveis clínicas e hematológicas. A análise univariada será realizada para verificar a associação entre o status do rebanho para a Tristeza Parasitária Bovina (TPB) e as variáveis de risco, utilizando o teste de qui-quadrado ($p < 0.05$).

Lages, 11 de maio de 2016

Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Coord. do Comitê de Ética em Experimentação Animal
Universidade do Estado de Santa Catarina

**ANEXO C – PARECER CONSUSTANIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
COM SERES HUMANOS (CEPSH) DA UDESC**



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



PARECER CONSUSTANIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Fatores de risco e Prevalência de Tristeza Parasitária em Bovinos da Raça Crioula Lageana.

Pesquisador: Joandes Henrique Fonteque

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 61975316.3.0000.0118

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SC UDESC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.068.771

Apresentação do Projeto:

Segunda versão de projeto para resposta às pendências do parecer 1.839.906 de 28/11/2016. Trata-se de projeto vinculado ao Programa de Mestrado em Ciência Animal do CAV/UDESC. Tem por objetivo determinar a prevalência de Anaplasma marginale, Babesia bovis e Babesia bigemina por meio da Reação em Cadeia da Polimerase-Multiplex (Multiplex-PCR) em bovinos da raça Crioula Lageana; realizar o exame físico, o hemograma, a determinação da concentração de proteína total plasmática e do fibrinogênio em bovinos da raça Crioula Lageana; determinar por meio da aplicação de questionário epidemiológico os fatores de risco para o desenvolvimento da Tristeza Parasitária em bovinos da raça Crioula Lageana; correlacionar os dados da prevalência e do hemograma com as varáveis analisadas. Serão entrevistados seis proprietários.

Equipe de Pesquisa: Joandes Henrique Fonteque (pesquisador responsável), Mariana da Silva Casa (mestranda).

Contextualização do problema/objeto de pesquisa: "Levantamentos epidemiológicos sobre a ocorrência de enfermidades no rebanho de bovinos da raça Crioula Lageana também estão sendo realizados e determinam importantes informações sobre a sanidade animal e auxiliam a traçar

Endereço: Av.Madre Benvenutta, 2007

Bairro: Itacorubi

CEP: 88.035-001

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3664-8084

Fax: (48)3664-8084

E-mail: cepsh.udesc@gmail.com



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 2.068.771

Recomendações:

Sem recomendações. O projeto encontra-se apto para aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências do parecer 1.839.906:

- 1 - Incluir no projeto básico a pesquisadora Mariana da Silva Casa; PENDÊNCIA CUMPRIDA.
- 2 - Inserir o questionário a ser aplicado junto aos produtores rurais, por caracterizar-se como um documento importante para análise ética e proteção dos participantes da pesquisa; PENDÊNCIA CUMPRIDA.
- 3 - Descrever no campo metodologia a etapa com os participantes e como se dará a aplicação do questionário junto aos produtores rurais. PENDÊNCIA CUMPRIDA.

As pendências anteriores foram cumpridas, o projeto encontra-se apto para aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado APROVA o Projeto de Pesquisa e informa que, qualquer alteração necessária ao planejamento e desenvolvimento do Protocolo Aprovado ou cronograma final, seja comunicada ao CEPHS via Plataforma Brasil na forma de EMENDA, para análise sendo que para a execução deverá ser aguardada aprovação final do CEPHS. A ocorrência de situações adversas durante a execução da pesquisa deverá ser comunicada imediatamente ao CEPHS via Plataforma Brasil, na forma de NOTIFICAÇÃO. Em não havendo alterações ao Protocolo Aprovado e/ou situações adversas durante a execução, deverá ser encaminhado RELATÓRIO FINAL ao CEPHS via Plataforma Brasil até 60 dias da data final definida no cronograma, para análise e aprovação.

Lembramos ainda, que o participante da pesquisa ou seu representante legal, quando for o caso, bem como o pesquisador responsável, deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo suas assinaturas na última página do referido Termo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJECTO_762961.pdf	09/05/2017 15:53:12		Aceito

Endereço: Av.Madre Benvenutta, 2007

Bairro: Itacorubi

CEP: 88.035-001

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3664-8084

Fax: (48)3664-8084

E-mail: cepsh.udesc@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.068.771

Outros	Projeto_de_mestrado_Mariana_da_Silva_Casa_CEPSH_Corrigido.doc	09/05/2017 15:52:28	Joandes Henrique Fonteque	Aceito
Outros	Respostas_a_Pendencias_CEP_Projeto_Fatores_de_risco_e_prevalecia_de_Tristeza_Parasitaria_em_bovinos_da_raca_crioula_lageana.doc	09/05/2017 15:51:58	Joandes Henrique Fonteque	Aceito
Outros	QUESTIONARIO_FATORES_DE_RISCO_TRISTEZA_PARASITARIA_BOVINA.	09/05/2017 15:27:20	Joandes Henrique Fonteque	Aceito
Outros	CETEA2461171115_Aprovado.pdf	09/05/2017 15:23:39	Joandes Henrique Fonteque	Aceito
Outros	Justificativa_TPB_Crioula_Lageana.pdf	09/05/2017 15:22:48	Joandes Henrique Fonteque	Aceito
Outros	Declaracao_ABCCL.PDF	01/11/2016 14:56:59	Joandes Henrique Fonteque	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoTPB.PDF	01/11/2016 14:55:06	Joandes Henrique Fonteque	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_TPB_Crioula_Lageana.doc	21/07/2016 11:00:21	Joandes Henrique Fonteque	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_TPB_Mariana_da_Silva_Casa_CEPSH.doc	21/07/2016 10:52:13	Joandes Henrique Fonteque	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 18 de Maio de 2017

Assinado por:
Carla Ivane Ganz Vogel
(Coordenador)

Endereço: Av.Madre Benvenuta, 2007

Bairro: Itacorubi

CEP: 88.035-001

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3664-8084

Fax: (48)3664-8084

E-mail: cepsh.udesc@gmail.com