

FATORES DE RISCO E PREVALÊNCIA DE *BABESIA BIGEMINA* EM BOVINOS DA RAÇA FLAMENGA

Jônatas Carissimi Lovatel¹, Louise Krueger¹, Julio de Matos Vettori², Luiz Cláudio Milette³, Carla Ivane Ganz Vogel³, Anderson Barbosa de Moura⁴, Mere Erika Saito⁴, Mariana da Silva Casa⁵, Joandes Henrique Fonteque⁶

¹ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária - CAV - bolsista PIVIC

² Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária - CAV

³ Professor Participante do Departamento de Produção Animal e Alimentos - CAV

⁴ Professor Participante do Departamento de Medicina Veterinária - CAV

⁵ Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - CAV

⁶ Orientador, Departamento de Medicina Veterinária CAV – joandes.fonteque@udesc.br

Palavras-chave: Bovino. PCR. Raça Flamenga.

O complexo babesiose/anaplasmosse apresenta-se como uma das principais enfermidades que afetam os bovinos causando perdas econômicas em decorrência da espoliação devido à infestação por carapatos, principal vetor, baixo ganho de peso, queda na produtividade, infertilidade, abortamento, alta mortalidade e custos envolvendo o tratamento, o controle e a profilaxia. A inexistência de dados na literatura sobre a doença afetando animais da raça Flamenga criados no estado de Santa Catarina justifica a necessidade de um levantamento epidemiológico e a realização do trabalho. O objetivo do trabalho foi determinar a prevalência de *Babesia bigemina* nos bovinos da raça Flamenga e realizar a avaliação da condição dos animais por meio do exame físico e do hemograma. Foram utilizados 40 bovinos machos e fêmeas, jovens e adultos, da raça Flamenga provenientes da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) - Estação Experimental de Lages. Os animais foram avaliados por meio do exame físico e colhidas amostras do número total de animais do rebanho por meio da venopunção jugular externa (10mL) em tubos a vácuo com anticoagulante EDTA 10%, que foram armazenados sob refrigeração sendo que cada amostra foi dividida em dois microtubos, devidamente identificados. Um dos tubos foi usado para realizar os exames hematológicos e outro para realizar a pesquisa dos agentes por meio da técnica de PCR no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do CAV-UDESC. O hemograma foi realizado por meio do método hemocitométrico e esfregaços sanguíneos corados com panótico rápido para a contagem diferencial de leucócitos. Os esfregaços sanguíneos foram visualizados em microscópio óptico sob objetiva de imersão (100x). A concentração de proteína total plasmática foi determinada pelo método de refratometria (refratômetro ATTAGO Co) e a determinação do fibrinogênio plasmático pelo método de precipitação pelo calor. O volume globular (VG) foi determinado pelo método de microhematócrito e calculado volume globular médio (VGM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina globular média (CHGM). A concentração de hemoglobina foi determinada por meio de equipamento eletrônico Theratio Plate® Tp analyzer, utilizando o kit reagente de cor Bioclin. Para a extração do DNA genômico total das amostras, utilizou-se kit comercial (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.



Após a extração, o DNA foi mensurado por meio de espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific) e diluído para manter-se uma concentração mínima de 20 ng/µL. Para amplificação do DNA genômico extraído das amostras de sangue e controles positivos, foram realizadas as reações de PCR, com primers específicos para o agente. Em microtubos de 0,2mL, foi adicionado um volume final de 25 µL de solução, contendo 1U de enzima Taq Polimerase GoTaq® Hot Start Polymerase, (Promega); 8,5 pmoles de cada par de primer; 0,2mM de nucleotídeos (dNTPs); 3,5mM de cloreto de magnésio; 5µL de tampão 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 3µL de DNA e água ultrapura para completar o volume final e ajustar a concentração dos reagentes. Um controle negativo 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 ultrapura, 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. Para detecção mais acurada foi realizada a nested PCR, com primers internos específicos para *B. bigemina*, nas condições de desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 63,3°C por 1 minuto e 73°C por 1 minuto, e 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. Na primeira lacuna do gel foi utilizado 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 por 01h00min, e visualização mediante exposição à luz ultravioleta. A análise univariada foi realizada para comparar as taxas de infecção por *B. bigemina* com o sexo dos animais, utilizando o teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$) e análise da Odds Ratio. 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 ($p \leq 0,05$). A prevalência encontrada para *Babesia bigemina* foi de 31%. Foi observada leucocitose por linfocitose nos animais avaliados e diferença no valor de linfócitos ($p=0,023$) entre positivos e negativos, podendo tal diferença ser atribuída a variações individuais ou outra doença não avaliada. O valor de plaquetas apresentou diferença entre positivos e negativos ($p=0,017$), porém permaneceram dentro dos valores de referência para a espécie. Não foram encontradas diferenças quando comparados machos e fêmeas em relação à chance de adquirir a infecção. Conclui-se que a prevalência de *Babesia bigemina* em bovinos da raça Flamenga é de 31%, de modo que esta população se encontra em situação de instabilidade enzoótica para a infecção. A chance de infecção não difere entre machos e fêmeas e as diferenças nas variáveis hematológicas avaliadas não podem ser atribuídas à infecção por *B. bigemina*.