

## **FATORES DE RISCO E PREVALÊNCIA DE *Babesia bovis* EM BOVINOS DA RAÇA FLAMENGA**

Leonardo Bergmann Griebeler<sup>1</sup>, Louise Krueger<sup>1</sup>, Jônatas Carissimi Lovatel<sup>1</sup>, Julio de Matos Vettori<sup>2</sup>, Luiz Cláudio Miletto<sup>3</sup>, Carla Ivane Ganz Vogel<sup>3</sup>, Anderson Barbosa de Moura<sup>4</sup>, Mere Erika Saito<sup>4</sup>, Mariana da Silva Casa<sup>5</sup>, Joandes Henrique Fontequê<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária - CAV - Bolsista PIVIC

<sup>2</sup>Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária - CAV

<sup>3</sup>Professor Participante do Departamento de Produção Animal e Alimentos - CAV

<sup>4</sup>Professor Participante do Departamento de Medicina Veterinária - CAV

<sup>5</sup>Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - CAV

<sup>6</sup>Orientador, Departamento de Medicina Veterinária - CAV –joandes.fontequê@udesc.br

Palavras-chave: Bovinos; Flamengo; Prevalência.

O complexo babesiose e anaplasmoses é uma das principais enfermidades que acometem bovinos no Brasil, levando a perdas econômicas, devido a presença do carrapato *Rhipicephalus microplus*, principal vetor da doença. Entretanto, existe uma carência informacional sobre a prevalência de *Babesia bovis* em bovinos da raça Flamengo no Brasil. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo determinar a prevalência de *Babesia bovis* em bovinos da raça Flamengo por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), assim como realizar o exame físico, hemograma e determinar a concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio. Foram utilizados 40 bovinos da raça flamenga, machos e fêmeas, jovens e adultos, fornecidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) – Estação Experimental de Lages. Realizou-se o exame físico e foram colhidas amostras de sangue por venopunção jugular externa em tubos a vácuo contendo anticoagulante EDTA 10%. As amostras foram utilizadas para a determinação do perfil hematológico, realizando a contagem total de eritrócitos e leucócitos, hematócrito, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de plaquetas e contagem diferencial de leucócitos, concentração de proteína total plasmática e fibrinogênio plasmático. Os tubos foram armazenados sob refrigeração, e posteriormente divididos em dois micro tubos, um utilizado para os exames hematológicos e o outro para a realização da PCR. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com panótico rápido, e visualizados em microscópio óptico sob objetiva de imersão (100x). A refratometria foi utilizada para determinar a concentração de proteína total plasmática, e o fibrinogênio plasmático pelo método de precipitação pelo calor. O volume globular (VG) foi determinado por meio do método do micro hematócrito. O contador automático de células (SDH3 Labtest<sup>®</sup>) foi utilizado para determinação da concentração de hemoglobina, contagens de eritrócitos e leucócitos totais, além do volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Kit comercial (Promega<sup>®</sup>) foi utilizado para a extração do DNA genômico total das amostras. Posteriormente, para a mensuração do DNA foi utilizado o espectrofotômetro Nano

Drop 2000® (Thermo Scientific) e diluído a fim de permanecer em uma concentração mínima de 20 ng/μL. A PCR foi utilizada para a amplificação do DNA genômico extraído das amostras de sangue e controles positivos. Os primers utilizados foram BoF 5' CAC GAG GAA GGA ACT ACC 3' e BoR 5' CCA AGG AGC TTC AAC GTA 3', sendo específicos para *Babesia bovis*, que amplifica um fragmento de 356pb. Foram adicionados um volume final de 2,5μL em microtubos de 0,2mL, contendo 1U de enzima Taq Polimerase GoTaq® Flexi Buffer (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 ultra pura para completar o volume final e ajustar a concentração dos reagentes. Foi utilizado um controle negativo, afim de garantir a qualidade e a especificidade da técnica, passando por todos os procedimentos citados anteriormente, apenas substituindo o uso de DNA genômico por água ultra pura, sem a presença de DNase. As condições ideais de temperatura foram determinadas pelo termociclador (Biocycler), passando inicialmente por uma desnaturação 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 por fim mais uma extensão final a 73°C por 7 minutos. Para aumentar a acurácia, foi realizado a nested-PCR, com os primers 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' para *B. bovis*, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 63,3°C por 1 minuto, 73°C por 1 minuto, e extensão final a 73°C por 7 minutos. Para a realização da eletroforese dos produtos da amplificação, foi utilizada uma cuba horizontal, contendo gel de agarose a 2% acrescentando corante Uniscience. Na primeira lacuna do gel utilizou-se marcador de peso molecular de 100pb para permitir determinar o tamanho das bandas das amostras. Foi utilizada fonte elétrica de 140 Volts durante 01h00min, e a posterior visualização foi realizada sob luz ultravioleta. Foram consideradas positivas para *B. bovis* bandas com 350pb e 290pb na primeira e segunda reação respectivamente. Para a análise estatística, afim de avaliar a normalidade, todos os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk. Para a comparação das médias das variáveis clínicas e hematológicas entre animais positivos e negativos, foi utilizado o teste t em dados considerados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para os não-paramétricos. Para a verificação da associação entre o sexo e a presença da infecção foi realizado o teste de qui-quadrado, admitindo-se probabilidade de erro de 5% para todos os testes. A prevalência do agente nesta população foi de 71%, demonstrando que os animais da raça Flamengo estão em situação de instabilidade enzoótica para o agente. Não foi constatada relação entre o sexo e a infecção por *B. bovis*. Com relação às variáveis hematológicas, os animais apresentaram leucocitose, no entanto, esta variável não diferiu entre animais positivos e negativos para *B. bovis*. Foram constatadas diferenças para variáveis VGM, fibrinogênio, leucócitos bastonetes e monócitos, mas não podem ser atribuídas à presença ou ausência da infecção, pois os valores encontravam-se dentro do intervalo de referência para a espécie. Conclui-se que a prevalência de *B. bovis* em bovinos da raça Flamengo é de 71%, caracterizando instabilidade enzoótica.