

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

Jônatas Carissimi Lovatel¹, Louise Krueger², Julio de Matos Vettori², Luiz Cláudio Miletto³, Carla Ivane Ganz Vogel³, Anderson Barbosa de Moura³, Mere Erika Saito³, Mariana da Silva Casa⁴, Joandes Henrique Fonteque⁵

¹ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária - CAV - bolsista PROBIC/UDESC.

² Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária – CAV.

³ Professor Participante do Departamento de Produção Animal e Alimentos – CAV.

⁴ Acadêmica do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – CAV.

⁵ 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 carrapatos, 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 é 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. Serão 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. Para a determinação dos fatores de risco será 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 às enfermidades, aos proprietários de cada propriedade analisada. 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% para a realização do perfil hematológico por meio da contagem total de eritrócitos e leucócitos, hematócrito, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e 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 transportados para o Laboratório Clínico Veterinário do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV-UDESC), Lages, onde 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. 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 será 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, utilizar-se-á kit comercial (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA será 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, serão realizadas as reações de PCR, com primers específicos para o agente. Em microtubos de 0,2mL, será 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 ultra pura para completar o volume final e ajustar a concentração dos reagentes. Um controle negativo será 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) envolverão 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 será 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 será realizada em cuba horizontal, em gel de agarose a 2% acrescido do corante Unisafe Dye. Na primeira lacuna do gel será utilizado marcador de peso molecular de 100pb como padrão para determinar o tamanho das bandas das amostras. As condições da fonte elétrica serão de 140 Volts por 01h00min, e visualização mediante exposição à luz ultravioleta. A análise univariada será 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 serão 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 utilizar-se-á o teste t para dados considerados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para os não-paramétricos ($p \leq 0,05$). As médias dos resultados das variáveis clínicas e hematológicas apresentaram-se dentro dos valores de referência para a espécie bovina, sendo observada apenas leucocitose por linfocitose na média dos valores dos animais amostrados. Uma vez que a análise molecular para o agente ainda não foi realizada, não é possível associar os dados das variáveis hematológicas à infecção por *Babesia bigemina*.