

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Efeitos da Riboflavina associada à luz ultravioleta na inativação de
Babesia bigemina em sangue bovino mantido sob refrigeração e
avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos.

RAFAEL DE OLIVEIRA REIS

BOTUCATU - SP
JANEIRO DE 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Efeitos da Riboflavina associada à luz ultravioleta na inativação de
Babesia bigemina em sangue bovino mantido sob refrigeração e
avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos.

RAFAEL DE OLIVEIRA REIS

Tese apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes
Co-orientador Dr. Pedro Paulo Pires

BOTUCATU - SP
JANEIRO DE 2011

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu -
UNESP

Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Reis, Rafael de Oliveira.

Efeitos da riboflavina associada à luz ultravioleta na inativação de *Babesia bigemina* em sangue bovino mantido sob refrigeração e avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos / Rafael de Oliveira Reis. – Botucatu, 2011

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Raimundo Souza Lopes

Assunto CAPES: 50501003

1. Bovino - Doenças - Tratamento. 2. Parasitologia veterinária.

Palavras-chave: *Babesia bigemina*; Bezerros; Irradiação; Transfusão, Vitamina B2

Título: Efeitos da Riboflavina associada à luz ultravioleta na inativação de *Babesia bigemina* em sangue bovino mantido sob refrigeração e avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. RAIMUNDO SOUZA LOPES

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dra. REGINA KIOMI TAKAHIRA

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dra.: ELIZABETH MOREIRA DOS SANTOS SCHMIDT

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA

Membro

Departamento de Parasitologia Veterinária

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

Prof.Dra. CECÍLIA BRAGA LAPOSY

Membro

UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA - UNOESTE

Data da Defesa: 24 de janeiro de 2011.

À Carolina Cunha Correa Reis. Minha Princesa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos ensinamentos, sei que é pouco usual agradecermos por isso, mas eu aprendi muito com Ele nesse ano que passou.

Ao meu orientador prof. Dr. Raimundo Souza Lopes pelos grandes ensinamentos que me permitiram atingir este objetivo.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo aporte financeiro para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Pedro Paulo Pires sem sua grande ajuda e enorme coração este trabalho não estaria finalizado.

A minha princesa Carolina, que deu um novo sentido a minha vida e por ela estou aqui vencendo mais esse desafio.

Aos meus pais Alcino e Solange e irmão Fabrício pelo apoio e dedicação que me permitiram atingir a realização de todos os meus sonhos.

Aos meus avós Nadir e Nilson (*in memorian*) que seja lá onde estiverem tenho certeza que estão muito, mas muito orgulhosos com o neto que fez patologia para estudar os patos e que depois se tornou no “neto que é veterinário”.

Aos meus tios e padrinhos Nadilson e Leila pelo apoio e incentivo eterno.

Ao meu primo Julinho que meu deu a honra de batizar sua princesinha Manuela.

Aos meus grandes amigos Koichi e Titi que me apoiaram em todos os momentos difíceis, sobretudo do ano que passou.

A todos meus velhos amigos: Anderson, Paulinho, Rafael Paiva, Sérgio e Alexandre que estiveram ao meu lado sempre, mesmo com a distância física entre nós, estavam sempre presentes aqui em meu coração.

Ao meu amigo Rafael Grobério por sua amizade e chatice quando pegava no meu pé, mas sei que fazia isso porque sempre quis o melhor para mim. Não esquecerei nunca das dicas que você me deu.

Aos meus novos amigos que fiz na Embrapa que fizeram com que a minha estadia em Campo Grande fosse inesquecível. Ao pessoal da casa dos estagiários. Como a Daiane diz, “na casa é tudo família, é tudo irmão”.

Fazendo um agradecimento especial a Andréia que esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis que passei em Campo Grande.

A toda a equipe da Embrapa Gado de Corte que me ajudaram muito e transformaram um projeto em realização. Se eu fosse citar os nomes de todos não caberiam nessa folha

Ao pessoal do laboratório Pet Lab e principalmente a médica veterinária, Silvia Regina Vinholi que foi muito solícita em emprestar seu laboratório para nossas análises e que por fim se tornou uma grande amiga também.

Ao professor Dr. João Pessoa Araújo Júnior e ao Dr. Flávio Paz pela grande ajuda na execução das PCR.

Ao professor Dr. Leucio Câmara Alves pelo auxílio na execução das Imunofluorescência indireta.

Ao professor Dr. Luis Calos Reis, grande mestre, que me ensinou os primeiros e mais importantes passos dentro da pesquisa científica.

A professora Dra. Regina Kiomi Takahira pelos ensinamentos e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos técnicos do Laboratório Clínico Veterinário, principalmente ao Márcio, pela ajuda nas dosagens bioquímicas deste experimento.

A professora Miriam Harumi Tsunemi do Departamento de Estatística pelo auxílio nas análises estatísticas dos dados.

Aos meus assessores de tecnologia da informação: Fabrício (Pintinho), Valério (Dadaia) e Quintino (EMBRAPA), sem eles com certeza eu não teria conseguido terminar essa tese.

As funcionárias da Biblioteca da UNESP-Botucatu, sobretudo a Marluci por sua dedicação e amizade.

A todos vocês que fizeram parte dessa importante fase da minha vida. O meu muito obrigado.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Variação dos valores médios da contagem total de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) e desvio padrão de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, $n=8$) e Grupo II (*Babesia bigemina*, $n=8$).....23
- Tabela 2.** Variação dos valores médios da Concentração da Hemoglobina (g/dL) e desvio padrão de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, $n=8$) e Grupo II (*Babesia bigemina*, $n=8$).....25
- Tabela 3.** Variação dos valores médios de Volume Globular (%) e desvio padrão de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, $n=8$) e Grupo II (*Babesia bigemina*, $n=8$).....26
- Tabela 4.** Variação dos valores médios de Proteína Plasmática Total (g/dL) e desvio padrão em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, $n=8$) e Grupo II (*Babesia bigemina*, $n=8$).....28
- Tabela 5.** Variação dos valores médios de Fibrinogênio (mg/dL) e desvio padrão em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, $n=8$) e Grupo II (*Babesia bigemina*, $n=8$).....30
- Tabela 6.** Variação dos valores médios da Contagem total de leucócitos (leucócitos/ μL) de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, $n=8$) e Grupo II (*Babesia bigemina*, $n=8$).....31
- Tabela 7.** Variação dos valores médios de Sódio (mg/dL) em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, $n=8$) e Grupo II (*Babesia bigemina*, $n=8$).....33
- Tabela 8.** Variação dos valores médios de Potássio (mg/dL) de bezerros mestiços, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, $n=8$) e Grupo II (*Babesia bigemina*, $n=8$).....34
- Tabela 9.** Variação dos valores médios de Lactato (mg/dL) de bezerros mestiços, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, $n=8$) e Grupo II (*Babesia bigemina*, $n=8$).....35
- Tabela 10.** Grau de parasitemia de *Babesia bigemina* no sangue coletado de bezerros mestiços dos grupos III ($n=2$), IV ($n=3$) e V ($n=3$). Análises realizadas 7, 14 e 21 dias após a inoculação.....37
- Tabela 11.** Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detectar anticorpos contra *Babesia bigemina* no sangue coletado de bezerros mestiços dos grupos III ($n=2$), IV ($n=3$) e V ($n=3$). Análises realizadas 7, 14 e 21 dias após a inoculação.....38
- Tabela 12.** Reação em Cadeia da Polimerase em sangue coletado de bezerros mestiços dos grupos III ($n=2$), IV ($n=3$) e V ($n=3$). Avaliação dos animais 7, 14 e

21 dias após a inoculação do sangue parasitado com <i>Babesia bigemina</i>	40
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variação dos valores médios do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido/média GI, n=8) e Grupo II (<i>Babesia bigemina</i> /média GII, n=8).....	24
Figura 2. Variação dos valores médios da Concentração da Hemoglobina (g/dL) de sangue bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, média GI, n=8) e Grupo II (<i>Babesia bigemina</i> , média GII, n=8).....	26
Figura 3. Variação dos valores médios de Volume Globular (%) de sangue bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, média GI, n=8) e Grupo II (<i>Babesia bigemina</i> , média GII, n=8).....	27
Figura 4. Variação dos valores médios de Proteína Plasmática Total (g/dL) em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido/Média GI, n=8) e Grupo II (<i>Babesia bigemina</i> /média GII, n=8).....	29
Figura 5. Variação dos valores médios de Fibrinogênio (mg/dL) em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, média GI, n=8) e Grupo II (<i>Babesia bigemina</i> , média GII, n=8).....	30
Figura 6. Variação dos valores médios do contagem total de leucócitos (leucócitos/ μL) de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, média GI, n=8) e Grupo II (<i>Babesia bigemina</i> , média GII, n=8).....	32
Figura 7. Variação dos valores médios de Sódio (mg/dL) em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, média GI, n=8) e Grupo II (<i>Babesia bigemina</i> , média GII, n=8).....	33
Figura 8. Variação dos valores médios de Potássio (mg/dL) de bezerros mestiços, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, média GI, n=8) e Grupo II (<i>Babesia bigemina</i> , média GII, n=8).....	35
Figura 9. Variação dos valores médios de Lactato (mg/dL) em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, média GI, n=8) e Grupo II (<i>Babesia bigemina</i> , média GII, n=8).....	37

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACD = Ácido-Citrato-Dextrose

ACDF = Ácido-Citrato-Dextrose-Fosfato

ATP = Adenosina Tri-Fosfato

CPD = Citrato-Fosfato-Dextrose

CPDA-1 = Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina

DNA = Ácido Desoxirribonucléico

HIV = Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida

IgM = Imunoglobulinas M

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR = Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta

TPB = Tristeza Parasitária Bovina

UV = Radiação ultravioleta

VCM = Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Transfusão sanguínea e alterações que ocorrem no sangue conservado em bolsas para transfusão.....	3
2.2. Babesiose bovina.....	8
2.3. Inativação de patógenos por Riboflavina (vitamina B2), associada à Luz ultravioleta.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3. 1. Instalações.....	15
3.2. Animais.....	15
3.3. Manejo e adaptação dos animais.....	15
3.4. Esplenectomias e Pós-operatório.....	16
3.5. Inóculos e monitoramento.....	16
3.6. Colheita e armazenamento das amostras.....	17
3.7. Etapas e Grupos experimentais.....	17
3.7.1. Primeira Etapa.....	17
3.7.2. Segunda Etapa.....	17
3.8. Exames laboratoriais.....	19
3.8.1. Hemograma.....	19
3.8.2. Dosagens Bioquímicas.....	19
3.8.3. Reação de Imunofluorescência Indireta.....	19
3.8.4. PCR em Tempo Real.....	19
3.9. Redução de patógenos através de tratamento com riboflavina e radiação ultravioleta.....	20
3.10. Pesquisa de esporocinetos em hemolinfa.....	21
3.11. Análises Estatísticas.....	21
3.12. Comitê de Ética.....	22
3.13. Projeto Fapesp.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Primeira Etapa.....	23
4.1.1. Contagem total de hemácias.....	23
4.1.2. Concentração da Hemoglobina.....	24

4.1.3. Volume Globular.....	26
4.1.4. Proteína Plasmática Total.....	27
4.1.5. Fibrinogênio Plasmático.....	29
4.1.6. Contagem total de Leucócitos.....	31
4.1.7. Concentração de Sódio Plasmático.....	32
4.1.8. Concentração de Potássio Plasmático.....	33
4.1.9. Concentração de Lactato Plasmático.....	35
4.2. Segunda Etapa.....	37
4.2.1. Esfregaço Sanguíneo Corado.....	37
4.2.2. Imunofluorescência Indireta.....	38
4.12. PCR em Tempo Real.....	39
4.2.4. Pesquisa de esporocinetos em hemolinfa.....	40
5. Conclusões.....	42
5.1. Conclusões da Primeira etapa do experimento.....	41
5.2. Conclusões da segunda etapa do experimento.....	41
6. Referências Bibliográficas.....	43
7 Trabalho a ser enviado a revista Pesquisa Veterinária Brasileira.....	50
7.1. Alterações hematológicas e bioquímicas que ocorrem no sangue bovino obtido de animais saudáveis e parasitados por <i>Babesia bigemina</i> quando conservado em bolsas plásticas contendo conservante ACD-F durante 21 dias.....	50
7.2. Avaliação da ação da Riboflavina associada à luz ultravioleta na inativação, redução ou completa eliminação de <i>Babesia bigemina</i> em sangue bovino mantido sob refrigeração.....	68
Anexos.....	83

REIS, R.O. **Efeitos da Riboflavina associada à luz ultravioleta na inativação de *Babesia bigemina* em sangue bovino mantido sob refrigeração e avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos.** Botucatu, 2011. 106p. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Com o objetivo de verificar possíveis alterações hematológicas e bioquímicas que ocorrem no sangue bovino obtido de animal hígido e parasitado com *Babesia bigemina*, quando conservado em bolsas plásticas contendo Citrato-fostato-dextrose-adenina (CPDA-1) e os efeitos da Riboflavina e radiação ultravioleta na inativação de *Babesia bigemina*. Na primeira etapa o grupo I foi formado por bolsas plásticas contendo sangue proveniente de bovinos saudáveis e o grupo II foi formado por bolsas plásticas contendo sangue de bovinos parasitados com *Babesia bigemina*. Foi determinado Contagem total de hemácias e leucócitos, Concentração da Hemoglobina, Volume Globular, Proteína Plasmática Total, Fibrinogênio, Sódio, Potássio e Lactato a cada três dias durante 21 dias. Na segunda etapa foi realizado Esfregaço Sanguíneo Corado, Reação de Imunofluorescência Indireta e Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa antes e após aplicação da Riboflavina e radiação ultravioleta, em seguida, o sangue foi inoculado em bezerros esplenectomizados. Esses exames foram repetidos nos dias sete, 14 e 21 pós-inoculação. O sangue conservado apresentou redução da contagem de hemácias e leucócitos, da Concentração da Hemoglobina, Volume Globular, Proteína Plasmática Total, Fibrinogênio e Sódio e ocorreu um aumento na concentração de Potássio e Lactato no decorrer de 21 dias. Observou-se que o sangue armazenado em bolsas plásticas sofre alterações hematológicas e bioquímicas após 21 dias de conservação. A *Babesia bigemina* não foi eliminada pela adição da Riboflavina e exposição à luz ultravioleta. Novos estudos devem ser realizados para verificar a eficácia desta técnica na inativação de patógenos que podem ser transmitidos por meio da transfusão sanguínea.

Palavras-chave: *Babesia bigemina*; Bezerros; Irradiação, Transfusão sanguínea; Vitamina B2.

REIS, R.O. Effects of Riboflavin associated with ultraviolet light in the inactivation of *Babesia bigemina* in bovine blood kept refrigerated and evaluation of hematological and biochemical parameters.

Botucatu, 2011. 106p. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to verify the possible hematological and biochemical alterations that occur in bovine blood obtained from healthy animals and from the ones infected with *Babesia bigemina* when kept in plastic bags with CPDA-1, and to verify the effectiveness of the treatment with Riboflavin in the inactivation of the *Babesia* sp. In the first part of the experiment, group I was formed by plastic bags with blood obtained from healthy bovines and group II by plastic bags with blood obtained from bovines infected with *Babesia bigemina*. In both groups the Red Blood Cells Count, Hemoglobin Concentration, Packed Cell Volume, Total Plasma Protein, Fibrinogen, White Blood Cells, Sodium, Potassium and Lactate was determined every three days, during 21 days. In a second phase the stained blood smear, indirect immunofluorescence reaction and quantitative Polymerase Chain Reaction to diagnose before and after the treatment with Riboflavin and ultraviolet radiation. The blood was inoculated in esplenectomized bovine. These exams were repeated on the days 7, 14 and 21 after the inoculation. In both groups the preserved blood presented reduction in the number of Erythrocytes, Leukocytes, Hemoglobin Concentration, Packed Cell Volume, Total Plasma Protein, Fibrinogen and Sodium and an increase of the Potassium and Lactate concentration occurred in the period of 21 days. The results were considered statistically significant ($p < 0,01$). This way it was observed that the blood preserved in plastic bags suffers hematological and biochemical alterations after 21 days of conservation. *Babesia bigemina* was not eliminated by the treatment with Riboflavin and ultraviolet radiation.

Key-words: *Babesia bigemina*; bovine; irradiation; transfusion; Vitamin B2.

1. INTRODUÇÃO

Desde os primeiros relatos de transfusões sanguíneas no século XVII, quando se transfundia sangue heterólogo na tentativa de se alterar o comportamento de quem o recebia, a medicina transfusional evoluiu lentamente. Porém, somente no século XX, sobretudo após a segunda guerra mundial, com o advento dos anticoagulantes, das substâncias conservantes e da descoberta dos grupos sanguíneos que ocorreu um grande avanço na hemoterapia. Para tanto, foi de fundamental importância a adequada conservação do sangue e seus derivados utilizados na transfusão sanguínea. O entendimento de que perdas significativas de sangue precisam ser corrigidas com fluidos exógenos data do início do século XVII, quando a primeira transfusão bem sucedida foi relatada em cães. Entretanto, a transfusão sanguínea somente começou a ser utilizada com frequência na medicina veterinária a partir dos anos 50 do século passado (LANEVSKI e WARDROP, 2001; REICHMANN e DEARO, 2001; CARTANA, 2010).

Recentemente, a hemoterapia tem se tornado cada vez mais acessível à medicina veterinária e muitos cuidados devem ser tomados para minimizar os riscos de transmissão de doenças provenientes dos animais doadores (REINE, 2004; WARDROP et al., 2005).

Relata-se a Tristeza Parasitária Bovina (TPB) como sendo uma parasitose provocada por protozoários do gênero *Babesia* (*B. bovis* e *B. bigemina*) e uma *rickettsia* denominada *Anaplasma marginale*. Esses parasitas são transmitidos por carrapatos. A transmissão da TPB pode ocorrer também pela transfusão sanguínea, embora relatos sobre a transfusão sanguínea em bovinos no Brasil sejam escassos (KESSLER et al., 1983; RODRIGUES et al., 2008).

As diversas técnicas de inativação de patógenos promovem uma maior segurança na terapia transfusional reduzindo as possibilidades de animais contraírem doenças provenientes do sangue contaminado (SOLHEIM e SEGATCHIAN, 2006). Uma técnica promissora é a da Riboflavina associada à radiação ultravioleta, que tem se mostrado eficaz na inativação de diversos patógenos. Dentre eles, podemos citar bactérias, vírus e protozoários

(SOLHEIM e SEGATCHIAN, 2006; CARDO et al., 2007; CALLAHAN et al., 2008; TERPSTRA et al., 2008).

À alta incidência de hemoparasitoses no rebanho bovino do país soma-se a grande dificuldade de combate ao vetor. Isto promove uma grande ocorrência de Babesiose e Anaplasmoses e torna o estudo da estabilidade *in vitro* de bolsas contendo sangue parasitado de significativa importância para o reconhecimento e acompanhamento das alterações que possam ocorrer nesse tecido no decorrer do tempo de armazenamento.

E em função da necessidade da utilização de sangue e seus derivados isentos de patógenos, o presente experimento foi realizado para avaliar a eficácia do tratamento com Riboflavina sob ação da luz ultravioleta na inativação de *Babesia bigemina* em sangue bovino conservado para transfusão.

Os objetivos deste experimento foram:

- Verificar as alterações hematológicas e bioquímicas que ocorreram no sangue obtido de bovinos saudáveis e parasitados com *Babesia bigemina*, quando conservado em bolsas plásticas contendo conservante Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenosina durante 21 dias.
- Verificar a efeito da adição da Riboflavina e radiação luz ultravioleta na inativação, redução ou completa eliminação de parasitas intracelulares como *Babesia bigemina*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Transfusão sanguínea e alterações que ocorrem no sangue conservado em bolsas para transfusão

A transfusão sanguínea é um tratamento emergencial que pode salvar a vida do animal. As indicações para a transfusão de sangue total ou de um de seus componentes incluem a necessidade do restabelecimento da capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, as deficiências na hemostasia, a transferência de imunidade passiva, a hipoproteïnemia e a hipovolemia (REICHMANN e DEARO, 2001).

A armazenagem de concentrados de hemácias para o uso clínico em bancos de sangue é limitada pelas perdas na integridade e função dos eritrócitos em decorrência da sobrevivência dessas células. As alterações que ocorrem nas hemácias contidas no sangue conservado para transfusão são denominadas de lesões de estocagem. A avaliação dessas lesões se coloca como uma etapa importante no controle de qualidade do hemocomponente a ser transfundido (TOMCZAK et al., 2010).

Antes de cada doação de sangue, o histórico do doador deve ser averiguado, o animal deve ser submetido a um exame físico e a testes de controle laboratoriais. O animal não deve estar sob qualquer tratamento, não deve ter histórico de doença grave ou contato com carrapatos, nem com outros hospedeiros ou vetores de doenças, não pode ter recebido transfusão sanguínea e, no caso de fêmeas, não deve estar prenhe (LACERDA, 2005).

A manutenção da deformabilidade normal da hemácia é essencial para o processo de entrega do oxigênio da hemácia para os tecidos. A deformação inadequada desta célula pode levar à hemólise por torná-la muito frágil ou, caso o eritrócito se torne muito rígido, pode causar uma oclusão capilar, não desempenhando assim sua função (FISCHER et al., 2004).

Segundo Lanevski e Wardrop (2001), heparina e citrato são anticoagulantes que não contribuem para a conservação das hemácias durante um armazenamento a longo prazo e o sangue total coletado com esses anticoagulantes deve ser utilizado dentro de 24h. Os conservantes mais comumente utilizados são o ácido-citrato-dextrose (ACD), citrato, fosfato dextrose (CPD e CPD-2) e o citrato-fosfato-dextrose-adenina (CPDA-1), no

qual é adicionado dextrose-fosfato-adenina para favorecer a viabilidade das hemácias, permitindo seu armazenamento por três a cinco semanas, dependendo do conservante utilizado.

Em bancos de sangue, as hemácias geralmente são armazenadas por 35 a 42 dias, a 4°C com uma viabilidade aceitável de 24h após a transfusão. São observadas importantes deteriorações na morfologia das hemácias e em sua deformabilidade durante a sua armazenagem. Mudanças morfológicas são normalmente associadas à redução da deformabilidade dos eritrócitos. A viabilidade dessas células é avaliada através da avaliação do pH sanguíneo, hemólise, níveis de ATP (adenosina tri-fosfato), níveis de glicose (GODINE e CAPRANI, 1997; SOUZA et al., 2009).

Wardrop et al., (1994) e Souza et al., (2009) também avaliaram o período de viabilidade de hemácias quando conservadas em solução contendo salina, adenina, dextrose e manitol. Segundo esses autores, esse sangue é viável durante um período de até 37 dias.

O sangue conservado em CPDA-1 tem suas propriedades preservadas melhor do que em ACD, permitindo a estocagem do sangue equino por 21 a 28 dias e de sangue bovino por 30 dias, sem perdas significativas da sua função. O sangue total pode ser utilizado para repor perdas de volume sanguíneo, hemácias, proteínas plasmáticas e fatores de coagulação estáveis como o fibrinogênio, por exemplo. A transfusão sanguínea deve ser utilizada como medida terapêutica emergencial de efeito limitado e transitório. Isto se deve ao fato do sangue bovino só se manter viável por cerca de dois a três dias após a transfusão. O curto tempo de sobrevivência das hemácias transfundidas também faz com que a indicação de transfusão em casos de anemias crônicas seja questionável (REICHMANN e DEARO, 2001).

Segundo Ribeiro Filho et al. (1994), sangue bovino conservado em ACD por 21 dias apresenta diminuição do número de eritrócitos devido à hemólise. Demonstra também aumento do Volume Corpuscular Médio (VCM) ao sétimo dia de conservação, sendo observada uma redução posterior desses valores, pelo desequilíbrio osmótico eritrocitário.

Para Salib e Dawson (1985) e Ribeiro Filho et al. (1994) existe uma enzima similar à quimiotripsina que foi isolada em leucócitos humanos e que

possui uma importante ação hemolítica. Esta proteína é liberada na ocasião da lise dos leucócitos. Assim a preservação dessas células íntegras é importante para minimizar a hemólise durante o período de estocagem do sangue destinado à transfusão. A degeneração de neutrófilos pode liberar proteases, ocasionando lesões na membrana dos eritrócitos, gerando uma população de hemácias mais frágeis.

O sangue canino conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 apresenta um aumento progressivo no VCM, ocasionado pelo acúmulo de lactato (PRINCE, 1988 *apud* RIBEIRO FILHO, 1992). Situação semelhante foi encontrada em sangue de ovinos conservado em CPDA-1. Foi verificado um aumento progressivo do VCM e redução do número de hemácias após vinte e um dias de conservação (SOUZA et al., 2009).

A armazenagem de concentrados de hemácias para o uso clínico em bancos de sangue é limitada pelas perdas na integridade e função das células em decorrência da meia vida. Uma das principais razões que prejudica a qualidade das bolsas de sangue é a redução da capacidade das células de combater a auto-oxidação durante o armazenamento. A conservação da morfologia e função do eritrócito melhora com a utilização do ácido α -lipóico, que estende o tempo de armazenagem do eritrócito contido em bolsas plásticas sem a perda da qualidade durante um período de até 50 dias (GEISE et al., 1999).

A diminuição da contagem total de leucócitos durante o período de conservação está ligada principalmente à degranulação dos polimorfonucleares, que degeneram mais rapidamente que os linfócitos. Foi demonstrado que sangue de búfalo armazenado em bolsas contendo CPD e ACD apresenta redução da contagem total de leucócitos, principalmente neutrófilos com o decorrer do tempo (SALIB e DAWSON, 1985). Apesar da diminuição da contagem total de leucócitos observada no decorrer do tempo de armazenagem, estas células podem estar em números aparentemente elevados pela presença de crioglobulinas, criofibrinogênio, plaquetas agrupadas e fibrina, quando contados em contadores automáticos de células. Apenas 3% dos neutrófilos armazenados por 72h em bolsas plásticas com CPDA-1 apresentam morfologia normal (RIBEIRO FILHO, 1992).

Há uma desnaturação protéica em sangue conservado que ocorre, provavelmente, devido ao pH ácido do meio onde esse sangue é armazenado. Sangue humano conservado em bolsas plásticas contendo Adenina-Citrato-Dextrose-Fosfato (CPDA-1) apresenta lesões na membrana eritrocitária provocada pela diminuição do pH (RIBEIRO FILHO, 1992). Evidências de redução da concentração de proteínas plasmáticas no decorrer do tempo também já foram observadas em sangue ovino (SOUZA et al., 2009).

Segundo Costa Júnior (2006), com a retirada do sangue da circulação, o metabolismo das células gera uma redução do pH, principalmente devido à metabolização da glicose pela via glicolítica anaeróbica que resulta na formação de lactato levando a um acúmulo de íons H^+ . O pH do sangue é altamente dependente da temperatura: a 37° C a produção de lactato é duas vezes maior que a 20° C e três vezes maior que a 15° C.

Segundo Almosny et al. (2000), quando a concentração de ATP dentro da hemácia diminui para 20% do valor normal, ocorre saída de potássio e entrada de sódio dentro da hemácia, fazendo com que essa célula se torne cilíndrica e, com isto, seja retirada da circulação sanguínea pelo sistema mononuclear fagocítico.

O sangue humano conservado em bolsas com CPD apresenta aumento de potássio. Este aumento é decorrente da solução preservadora, do tempo de conservação, da redução da atividade da enzima de Na/K ATPase, da temperatura de estocagem e da hemólise que ocorre no sangue durante o período de conservação (MICHAEL et al., 1975). Quando ocorre a lise da membrana celular da hemácia ocorre a liberação de potássio contido no meio intracelular. Isto leva ao aumento dos valores desse íon no interior da bolsa de sangue conservado (SOUZA et al., 2009).

O sangue conservado apresenta redução da atividade da enzima Sódio/Potássio ATPase com o decorrer do tempo promovendo o acúmulo de íons sódio intracitoplasmático e de potássio no meio extracelular. Esta alteração foi verificada em pesquisas realizadas com sangue humano, ovino e canino (MICHAEL et al., 1975; COSTA JÚNIOR, 2006; SOUZA et al., 2009).

A intoxicação por sangue conservado com altas taxas de potássio é pouco comum. Cuidados devem ser tomados em pacientes nefropatas ou com

lesões musculares intensas e crianças que recebem transfusões frequentes. Nestes casos, foi recomendada a utilização de sangue conservado por menos de 14 dias ou concentrado de hemácias, pois a maior parte do potássio livre contido em bolsa é encontrada no plasma. (MICHAEL et al., 1975).

Em estudo feito por Rickard (1970) o sangue de ratos infectados com *Babesia rodhaini* apresentou elevada concentração de lactato devido ao maior consumo de frutose e maltose que ocorreu em razão da hemoparasitose.

Segundo Razouk e Reiche (2004), existe uma preocupação especial com a contaminação bacteriana do concentrado de plaquetas devido a sua estocagem à temperatura ambiente, devendo-se respeitar seu prazo de validade. O risco de sepse relacionado às plaquetas é estimado em 1:12.000, mas é maior quando a transfusão de concentrado de plaquetas é obtido de múltiplos doadores, do que a transfusão de uma unidade de plaquetas obtida por aférese de um único doador. O alto risco de crescimento bacteriano com o tempo justifica a vida média das plaquetas estocadas entre 20° e 24°C ser de cinco dias. Em ordem decrescente, os microrganismos mais comumente envolvidos em mortes são *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus epidermidis*.

Um dos riscos associados à transfusão de sangue inclui a transmissão de doenças hematógenas. Um programa de seleção apropriada de doadores sanguíneos para doenças infecciosas deve ser realizado para minimizar os riscos de transmissão de tais doenças (WARDROP et al., 2005). A transmissão iatrogênica pode ser controlada por medidas higiênicas que, eventualmente, poderão eliminar a doença quando o carrapato não está presente (ABDALLA et al., 1998).

O baço, como órgão do Sistema Mononuclear Fagocitário, tem importante papel na defesa orgânica devido a seus mecanismos de filtração e fagocitose, além da produção de fatores do complemento e imunoglobulinas, em especial a IgM. A sua importância pode ser comprovada pela gravidade da sepse que atinge mais de 2% de indivíduos esplenectomizados, com maior destaque em crianças, que possuem o sistema imunitário ainda imaturo, e em pessoas imunodeprimidas (RESENDE e PETROIANU, 2002).

A esplenectomia prejudica a formação de imunoglobulinas M (IgM), especialmente na resposta primária, envolvendo a síntese de anticorpos. As IgM aparecem no início da resposta imunológica e são anticorpos fixadores de complemento e aglutinantes, sendo responsáveis por 75% da atividade de fixação de complemento, enquanto as Imunoglobulinas G (IgG) aparecem mais tarde persistindo por vários meses (VIDOTTO e MARANA, 2001; RESENDE e PETROIANU, 2002).

A transfusão sanguínea pode promover a transmissão das seguintes parasitoses Anaplasmoze, Babesioze, Micoplasmoze, Sarcocistoze, Theileríase, Toxoplasmoze, Tripanossomíase, além de viroses, tais como Hepatite Infecciosa Canina e Leucemia Felina (JAIN, 1993; WEISS e WARDROP, 2010).

Segundo Kessler (2001), a transmissão iatrogênica de patógenos ocorre frequentemente nas seguintes situações: (1) transfusão de sangue; (2) cirurgias coletivas (descorna e castração) quando não se tem o cuidado de lavar e esterilizar os instrumentos no intervalo entre um bovino e outro; (3) vacinações com seringas automáticas, principalmente quando se usa a mesma agulha para vários animais. Estas são consideradas maneiras frequentes de transmitir *Anaplasma* spp, bem como outros patógenos.

2.2. Babesioze bovina

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é uma parasitose provocada por protozoários do gênero *Babesia* (*B. bovis* e *B. bigemina*) e uma Rickétsia denominada *Anaplasma marginale*. Esses parasitas são transmitidos por carrapatos, sendo o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a espécie mais comum no Brasil e seu principal transmissor (KESSLER et al., 1983; PEREIRA, 2006; RODRIGUES et al., 2008).

O impacto econômico da Tristeza Parasitária Bovina no Brasil, considerando a mortalidade e as perdas indiretas como queda na produção de leite, diminuição do ganho de peso e custos do controle e profilaxia, foi estimado que pudesse ultrapassar os US\$ 500 milhões anuais. (GRISI et al 2002; KESSLER et al., 2002; ALMEIDA, 2006).

O período de incubação da babesiose varia de 7 a 10 dias e *Babesia* sp é inoculada no bovino durante a fase larval do carrapato. A transmissão de *B. bovis* para bovinos ocorre exclusivamente pelo carrapato *Rhiphicephalus (B.) microplus*. A transmissão mecânica por vetores biológicos, insetos hematófagos ou fômites ocorre na anaplasmoze causada por *Anaplasma marginale*, outro componente do Complexo Tristeza Parasitária Bovina (SCHILD et al., 2008).

Os sinais clínicos da babesiose em bovinos parasitados são caracterizados por febre, anemia, hemoglobinemia, hemoglobinúria, ataxia e, em muitos casos, morte (BAZAN et al., 2008; BULING et al., 2007).

A babesiose é um problema mais acentuado em regiões marginais ou de instabilidade enzoótica, onde as condições climáticas são desfavoráveis à manutenção de populações de carrapatos por longos períodos. Deste modo, parte da população bovina não se infecta com *Babesia* sp nos primeiros meses de vida e, conseqüentemente, não desenvolve imunidade ativa antes do desaparecimento de anticorpos colostrais. Outra situação em que a babesiose se torna um problema é na introdução de bovinos provenientes de áreas livres de babesiose em áreas endêmicas desta doença (MADRUGA et al., 2003; SOARES et al., 2000 e BAZAN et al., 2008).

Segundo Araújo et al. (2003), nos casos em que há necessidade de se fazer a proteção (imunização) do rebanho, podem ser utilizados diferentes métodos. A premunição, que consiste na inoculação de sangue de bovinos recuperados da doença (doadores) em bovinos que se deseja imunizar (receptores), é o método mais comum em nosso meio.

O processo se baseia na inoculação de sangue de animais portadores em animais susceptíveis e com o seu subsequente tratamento usando drogas específicas. Essa medida determina uma proteção à infecção, mesmo que ocorram variações entre amostras das espécies dos hemoparasitas e, em condições tropicais, é provavelmente o procedimento de imunização mais eficaz. Apesar de a premunição apresentar alto custo, riscos como disseminação de doenças e a ocorrência da “doença hemolítica do recém-nascido”, são fatores mínimos se comparados àqueles ocasionados pela

introdução de bovinos susceptíveis e não protegidos em áreas enzoóticas (GONÇALVES, 2000).

Embora décadas tenham se passado desde as primeiras tentativas de imunização de bovinos contra a babesiose – por Smith e Kilborne nos EUA, por meio da inoculação de sangue de animais portadores que haviam se recuperado da doença (premunição) –, nos países em desenvolvimento, particularmente no Brasil, os mesmos princípios de imunização ainda são utilizados em nível de campo, principalmente em bovinos oriundos de regiões livres da doença (VIDOTTO, 2002).

Em áreas enzoóticas, os bezerros recém-nascidos recebem anticorpos através do colostro, que os protegem durante os primeiros meses de vida. A exposição gradativa desses animais ao vetor e, conseqüentemente, ao parasita, é responsável pelo desenvolvimento de imunidade ativa, que resulta em menos ocorrências de casos clínicos de babesiose (BAZAN et al., 2008).

A capacidade de o hospedeiro superar uma infecção por *Babesia* sp é determinada não apenas por respostas imunes específicas, mas por características inatas do mesmo. Fatores genéticos, fisiológicos e bioquímicos participam de um tipo de resistência do organismo que promove o controle da parasitose antes mesmo do desenvolvimento de anticorpos contra *Babesia* sp. Existem evidências de que alguns bovinos, sobretudo *Bos indicus*, são mais resistentes a enfermidades parasitárias (KESSLER, 1983).

Bovinos da raça Nelore infectados experimentalmente por *Babesia bigemina* apresentaram achados laboratoriais com baixos níveis de parasitemia, decréscimo nos valores do eritrograma, ausência de reticulócitos, diminuição inicial na contagem total de leucócitos, neutrófilos e linfócitos com posterior elevação do número destas células; hiper celularidade da série eritrocítica e decréscimo da relação mielóide:eritróide mais acentuada entre o 8º e 12º dia pós infecção e um aumento da fragilidade osmótica eritrocitária nos grupos inoculados (MENDONÇA et al., 2003).

O diagnóstico da babesiose pode ser realizado por meio de esfregaço sanguíneo corado, da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ELISA. Atualmente tem sido utilizada a biologia molecular no diagnóstico da Tristeza Parasitária Bovina com a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase

(KRAUSE et al., 1996; MARTINS et al., 1996; MADRUGA et al., 2000; SACCO et al., 2001; TAVARES-MARQUES e REYNA-BELLO, 2006; BAZAN et al., 2008).

A babesiose é classicamente diagnosticada por meio da visualização direta do parasita no esfregaço sanguíneo corado. Porém, quando o grau de parasitemia é muito baixo, em infecções latentes ou subclínicas, a visualização do parasita em lâmina se torna difícil. Animais que se recuperam de infecção primária tornam-se portadores e, nestes animais, a parasitemia é virtualmente indetectável à microscopia óptica e infecções subclínicas podem durar por longos períodos. A detecção de anticorpos específicos no soro de portadores se mostrou uma alternativa eficaz nesses casos. A Reação de Imunofluorescência Indireta demonstrou correlação de 90,1% com a técnica de ELISA. Isto comprova que as duas técnicas são bastante sensíveis no diagnóstico da babesiose (MARTINS et al., 1996; PEREIRA, 2006; BULING et al., 2007).

Segundo Krause et al., (1996) e Pereira, (2006), apesar da possibilidade do diagnóstico ser realizado por meio do esfregaço sanguíneo corado, a técnica da PCR é muito útil nos casos agudos de babesiose, nos quais eventualmente os parasitas podem não ser visualizados em lâminas nos primeiros dias de infecção. Esta técnica é tão sensível quanto o esfregaço sanguíneo e a inoculação em animais de laboratório para o diagnóstico da infecção por *Babesia bigemina*. Vários esfregaços sanguíneos corados devem ser examinados para a identificação do hemoparasita, já que menos de 1% dos eritrócitos estão parasitados na primeira semana da enfermidade. Assim, é relativamente comum a ocorrência de diagnósticos falso-negativos. Por isso, existe a necessidade da associação de diversas técnicas de diagnóstico simultaneamente, tais como esfregaço sanguíneo corado, Reação de Imunofluorescência indireta e PCR.

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é uma técnica sorológica amplamente empregada, tem baixo custo, porém é mais laboriosa (TIZARD, 2009).

Formas alternativas da PCR têm sido desenvolvidas para aumentar a sensibilidade desta técnica. Dentre elas podemos citar PCR Multiplex, PCR-

Nested ou Semi-Nested. O Multiplex é utilizado para detectar diferentes espécies de microorganismos em uma mesma amostra. O Nested é uma modificação da técnica da PCR que visa aumentar sua sensibilidade. Nesse procedimento, o produto amplificado é submetido a um segundo método de amplificação (PEREIRA, 2006).

Segundo BULING et al. (2007), a reação em cadeia da polimerase quantitativa, também conhecida como qPCR ou PCR em tempo real é um novo e sensível método de detecção e quantificação do DNA de *Babesia* sp.

O advento das técnicas moleculares de diagnóstico propiciou a conjugação de elevada sensibilidade e especificidade com a possibilidade de detecção do próprio parasita e não de anticorpos. Essa característica é particularmente interessante, pois permite discriminar os animais infectados que apresentam baixa parasitemia daqueles que, por terem eliminado as infecções, não são fonte de infecção para os carrapatos. A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase é baseada na amplificação de milhões de cópias de uma região específica do genoma de qualquer organismo, utilizando-se uma enzima DNA-polimerase termoestável, oligonucleotídeos livres e sequências de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), em um tampão contendo substâncias que favorecem a reação (FIGUEROA et al., 1993; BÖSE et al., 1995; COSTA-JUNIOR, 2006).

A falha na detecção da *Babesia* sp em uma alíquota de sangue de 0,5 mL pode ser devido à coleta inadequada da amostra, à parasitemia crônica ou ao sequestro do parasita por regiões como sistema nervoso central e medula óssea (KRAUSE et al., 1996).

2.3. Inativação de patógenos por Riboflavina (vitamina B2), associada à Luz ultravioleta

Existem diversas técnicas utilizadas para inativação de patógenos em bolsas de sangue para transfusão. Dentre elas podemos citar a Radiação Ultravioleta e o Azul de Metileno, Psoralen, Nanofiltração, Fracionamento Cohn, Pasteurização, Técnica Solvente-Detergente, Inativação por Violeta de Genciana e por Riboflavina e Radiação Ultravioleta (SOLHEIM e SEGATCHIAN, 2006).

O tratamento de bolsas de sangue para transfusão sanguínea com o uso da técnica com Riboflavina e luz ultravioleta tem se mostrado muito eficaz. O conhecimento do perfil toxicológico da riboflavina e de seus derivados, seu extenso uso em nossa dieta, assim como o auxílio de um fotossintetizador eficiente na inativação de patógenos, tornou este método um candidato promissor para ser utilizado nos sangue e seus derivados (GOODRICH et al., 2000).

O método que aplica a Riboflavina (vitamina B2), associada à Luz ultravioleta, apresenta uma grande vantagem em relação às demais técnicas de inativação de patógenos, pois, diferentemente das demais, não é necessário a retirada de metabólitos, antes de transfundir o sangue ao receptor. A bioquímica, a toxicidade e a capacidade da riboflavina de interagir com ácidos nucleicos após a fotoativação são largamente estudadas. (SOLHEIM e SEGHATCHIAN, 2006; CARDO et al., 2007; CALLAHAN et al., 2008).

A Riboflavina em associação com a luz ultravioleta (280-360nm) danifica oxigênio *singlet* e formação de peróxido de hidrogênio com a formação de radicais hidroxila e, por isso, o dano ao DNA do patógeno pode ocorrer na ausência de oxigênio. A técnica da riboflavina/uv apresenta a vantagem de que os componentes do sangue, úteis para a transfusão, não necessitam de DNA intacto para sua eficácia após a transfusão. (CARDO et al., 2007).

O uso da Riboflavina em combinação com a luz ultravioleta tem uma efetividade na inativação de uma grande gama de patógenos, tais como o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) tanto intra quanto extracelular, vírus pseudorrábico, vírus do Nilo ocidental, parvovírus, bactérias gram positivas (*Staphylococcus epidermitis*), bactérias Gram negativas (*Escherichia coli*), e contra o protozoário *Leishmania* sp, sem comprometer os componentes sanguíneos pelos subprodutos tóxicos ou que induzem a efeitos colaterais adversos. (SOLHEIM e SEGHATCHIAN, 2006; CARDO et al., 2007; CALLAHAN et al., 2008; TERPSTRA et al., 2008).

Ainda segundo MARTINS et al., (2008) o tratamento com Riboflavina/UV foi efetivo contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* meticilina-resistente, *Pseudomonas*

aeruginosa multirresistente e *Streptococcus pneumoniae* resistente a drogas. Porém, foi ineficiente contra *Candida albicans*.

Para Solheim e Seghatchian, (2006) uma grande vantagem desta técnica é que ela promove uma intensa redução dos níveis virais do sangue a ser transfundido, elimina o período de viremia do vírus do Nilo ocidental e elimina bactérias e leucócitos associados à maioria das reações pós-transfusionais fatais.

Segundo Cardo et al.(2007), o uso da associação da Riboflavina com Radiação Ultravioleta utilizando o aparelho Mirasol PRT demonstrou eficácia na inativação de *Trypanosoma cruzi* contido em bolsas para transfusão contendo plasma e plaquetas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Instalações

O experimento foi realizado no Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte - EMBRAPA, Campo Grande, MS, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, no Laboratório Clínico Veterinário, do Hospital Veterinário Prof. Dra. Aguemi Kohayagawa, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) - UNESP, Campus Botucatu, SP. E no Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto de Veterinária da UFRuralRJ.

3.2. Animais

Foram utilizados dez bovinos mestiços das raças Nelore e Caracu, machos e fêmeas com idade, entre oito e 12 meses. O peso dos bezerros variou de 188 a 260 kg. Os bezerros foram fornecidos pela Embrapa-Gado de Corte. Campo Grande.MS.

3.3. Manejo e adaptação dos animais

Antes do início do experimento os animais foram desverminados com aplicações subcutâneas de ivermectina e vacinados contra Brucelose, Leptospirose, Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e Diarréia Viral Bovina. Os animais eram clinicamente sadios e recebiam concentrado pela manhã. O volumoso (feno) era fornecido duas vezes ao dia e, assim como a água, estavam disponíveis *ad libitum*.

A seleção dos animais para inclusão no experimento era feita por meio da Reação em Cadeia da Polimerase para a detecção de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. Somente os animais que não apresentavam estes hemoparasitas foram incluídos no estudo.

Trinta dias antes do início do experimento, os animais selecionados foram colocados em baias individuais no setor de isolamento da Embrapa – Gado de Corte. Foram submetidos a rigoroso controle de ectoparasitas. Isto era feito por meio de banho carrapaticida com solução de Amitraz a cada 15 dias durante dois meses. Após serem inseridos nas baias do isolamento, os animais foram tratados com ectoparasiticida à base de Fipronil por todo o

período do experimento. Durante o período de adaptação, os animais eram manipulados duas vezes ao dia, com o intuito de se acostumarem com o manejo do experimento.

3.4. Esplenectomias e pós-operatório

Oito bezerros que futuramente participariam dos grupos III e IV foram submetidos à cirurgia de esplenectomia total conforme técnica descrita por Alves et al. (1984), para que, na ausência do baço, se tornassem mais suscetíveis à infecção por *Babesia bigemina* conforme descrito por Vidotto e Marana (2001), Resende e Petroianu (2002). Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos a jejum alimentar de 24 horas e privação hídrica de 12 horas. Foi realizada contenção química com 0,25 mg.kg⁻¹ de cloridrato de xilazina associado a cloridrato de quetamina na dose de 5 mg.kg⁻¹ por via endovenosa. Foi realizado bloqueio anestésico local com lidocaína associada à adrenalina utilizando-se a técnica de L invertido. As esplenectomias foram realizadas por meio de laparotomia pelo flanco. O pós-operatório foi realizado por antibióticoprofilaxia com enrofloxina na dose de 5 mg.kg⁻¹ por via intramuscular, uma vez ao dia durante cinco dias. A analgesia foi realizada com antiinflamatório não esteroide à base de flunixin meglumine na dose de 1,1 mg.kg⁻¹, uma vez ao dia por três dias consecutivos. Os curativos foram realizados por limpeza do ferimento com solução fisiológica a 0,9% e posterior aplicação tópica de tintura de iodo e pomada de unguento. Esse procedimento foi repetido diariamente até a cicatrização completa da ferida cirúrgica.

3.5. Inóculos e monitoramento

Três semanas após a esplenectomia, um animal foi inoculado com uma alíquota de 2 mL de sangue crio preservado contendo 3x10⁶ hemácias parasitadas com *Babesia bigemina* fornecida pela EMBRAPA-Gado de Corte, com o intuito de promover parasitemia nesse bezerro para que o mesmo fosse utilizado como doador das bolsas de sangue. Esse bovino foi monitorado diariamente por meio da avaliação do Volume Globular (VG) e esfregaço sanguíneo corado para verificar a diminuição do VG e o grau de parasitemia obtido, conforme técnica descrita por Weiss e Wardrop (2010). O sangue foi

colhido para conservação em bolsa plástica, quando foi possível a identificação por microscopia ótica (microscópio Carl Zeiss Primo Star, objetiva de imersão, aumento de 1000 vezes) da *Babesia bigemina* no esfregaço sanguíneo corado e ao atingir valor de 15% de Volume Globular.

3.6. Colheita e armazenamento das amostras

As amostras foram colhidas por meio de punção da veia jugular externa, com os animais em estação contidos adequadamente. O local para a colheita foi preparado com antissepsia com álcool iodado. Foram colhidos 450 mL de sangue para cada bolsa plástica contendo conservantes do tipo Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina-1 (CPDA-1) e mantidas refrigeradas em geladeira a temperatura de 1 a 4° C durante 21 dias. Durante a colheita o sangue foi movimentado constantemente de modo que o mesmo fosse apropriadamente homogeneizado aos seus conservantes. Para facilitar a colheita, a bolsa plástica ficou em um nível mais baixo de modo que a força da gravidade ajudasse no processo de preenchimento da bolsa.

3.7. Etapas e Grupos Experimentais

O experimento foi dividido em 2 etapas:

3.7.1. Primeira etapa:

O grupo I foi composto por oito bolsas plásticas contendo sangue obtido de bezerro hígido e o grupo II foi formado por oito bolsas plásticas contendo sangue bovino parasitado por *Babesia bigemina* proveniente de um animal positivo. Em ambos os grupos houve a retirada de amostras sanguíneas das bolsas a cada três dias para a realização dos exames hematológicos e bioquímicos. Foram realizadas as seguintes análises: Volume Globular, Contagem da Contagem total de hemácias e leucócitos, Concentração da Hemoglobina, Proteína Plasmática Total, Fibrinogênio Plasmático e Concentração Plasmática de Sódio, Potássio e Lactato.

3.7.2. Segunda etapa:

Em um primeiro momento foi feito esfregaço sanguíneo corado, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) para avaliação da presença de *Babesia bigemina*. Depois,

este sangue bovino parasitado foi submetido ao tratamento com Riboflavina e à Radiação Ultravioleta. Após o tratamento, o sangue foi novamente submetido à avaliação por Reação de Imunofluorescência Indireta, esfregaço sanguíneo corado e qPCR para verificar se os hemoparasitas contidos nesse sangue foram inativados, reduzidos ou destruídos por completo. Posteriormente, esse sangue foi inoculado em animais esplenectomizados para verificar se permanecia ou não com capacidade de transmitir a hemoparasitose. Os bezerros foram divididos em: Grupo III - formado por dois animais esplenectomizados que receberam sangue parasitado sem tratamento por Riboflavina e Luz ultravioleta; Grupo IV - formado por três animais hígidos e Grupo V - formado por três animais esplenectomizados.

Os bezerros dos grupos IV e V foram inoculados com sangue bovino parasitado após tratamento com Riboflavina e Luz ultravioleta.

Para a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o sangue para obtenção do soro foi colhido por venopunção da veia jugular externa em tubos a vácuo siliconizados (Vacutainer ®), com a finalidade de detectar a soroconversão e para determinar a titulação de anticorpos. A prova de RIFI foi realizada conforme metodologia descrita por Madruga et al. (1986).

Os animais foram avaliados diariamente por meio de Esfregaço Sanguíneo Corado, Volume Globular, avaliação da coloração das mucosas, comportamento e temperatura corpórea.

A amostra foi colhida por punção de sangue periférico de ponta de orelha para a realização de esfregaço sanguíneo corado e Volume Globular, conforme WEISS e WARDROP (2010).

Sete dias após a inoculação de sangue, foram feitas colheitas de amostras sanguíneas de todos os animais para diagnóstico de hemoparasitose por meio de: esfregaço sanguíneo corado (WEISS e WARDROP, 2010), da técnica da Reação de Imunofluorescência Indireta (MADRUGA et al., 1986) e do qPCR conforme Buling et al. (2007). Esse processo foi repetido novamente nos dias 14 e 21 pós-inoculação.

3.8. Exames laboratoriais

3.8.1. Hemograma:

- As determinações da Contagem total de hemácias e leucócitos e Concentração da Hemoglobina foram realizadas no contador automático de células CELM®, CC 530.
- A determinação do Volume Globular foi realizada por meio da técnica de microhematócrito, conforme descrito por Weiss e Wardrop (2010);
- As dosagens de Proteína Plasmática Total e Fibrinogênio foram realizadas por meio de refratometria, segundo Weiss e Wardrop (2010).

3.8.2. Dosagens Bioquímicas:

- A concentração plasmática de Sódio e Potássio plasmáticos foi determinada através da técnica de fotometria de chama no fotômetro FC-280. Pelo Método do kit CELM®.
- A determinação de Lactato plasmático foi realizada no aparelho Cobas Mira Plus, Roche®. Pelo Método do kit Katal®.

3.8.3. Reação de Imunofluorescência Indireta:

Esta técnica foi realizada conforme preconizado por Madruga et al. (1986).

Primeiramente, os soros testes e controle foram diluídos na proporção 1/160 onde foram colocados 10µl em cada poço. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C e posteriormente as lâminas foram lavadas três vezes durante dez minutos. Foi adicionado 10µl do conjugado (1/320) em cada poço e incubados por 30 minutos a 37°C. As lâminas foram lavadas por três vezes durante dez minutos. Após a secagem, as lâminas foram secadas e observadas em microscópio de Imunofluorescência; animais que apresentam titulação maior que 1/160 foram considerados positivos e com infecção ativa.

3.8.4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR):

Este teste laboratorial foi realizado conforme a técnica preconizada por Buling et al. (2007). Para o diagnóstico de *B. bigemina*, uma região de aproximadamente 170 pares de base do gene 18S rRNA foi amplificada por meio de um protocolo baseado numa reação de Double-PCR, utilizando os mesmos *primers* da reação de Real Time PCR.

A amplificação por PCR foi realizada em um volume final de 25µl contendo 12.5 µl de 2X GoTaq® Green Master Mix buffer [pH 8.5, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3.0 mM MgCl₂], 10 pmol de cada Primer, 5% de dimethyl sulfoxide (DMSO) e 5µl do DNA da amostra.

As condições de amplificação da reação seguiram o protocolo: 1 ciclo de incubação inicial a 95°C por 5 minutos para desnaturação das fitas de DNA, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 60 segundos, 59-53°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Foi adicionado 2µl do produto de PCR da reação primária à reação secundária.

Para a segunda fase da reação (Double-PCR), o protocolo seguiu as mesmas condições de reagentes descritos acima para a reação de PCR no volume final de 23µl. As condições de amplificação, temperaturas e tempos da reação de Double-PCR foram idênticas à reação primária da PCR, exceto que o total de ciclo foi de 35.

Os produtos das reações de Double-PCR foram submetidos à eletroforese¹ em gel de agarose² 1.5% em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) [1M Tris-HCl (pH 8.0), 0,83M ácido bórico, 20mM Edta] e revelados com SybrSafe³ (1µl/10ml). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA⁴ de 100 pares de base, sendo fotografados em equipamento⁵ de captura de imagem de gel e analisados com *software* específico⁶.

3.9. Redução de patógenos por meio do Tratamento com Riboflavina e Radiação Ultravioleta

A técnica utilizada neste experimento corresponde a uma adaptação do procedimento realizado por Bryant e Klein (2007) e Cardo et al. (2007). O sangue armazenado em bolsas para transfusão contendo CPDA-1 foi adicionado a 500µM de Riboflavina diluída em solução fisiológica de modo a atingir a concentração final de 50 µM com pH entre 4 e 5. O sangue colocado

¹ Electrophoresis Power Supply model EPD 600—Amersham-Pharmacia Biotech® Inc.

² Sigma-Aldrich® co.

³ SyBR® safe DNA gel stain – Invitrogen -USA

⁴ 100 Base-pair Ladder—Amersham-Pharmacia Biotech® Inc.

⁵ AlphaImager - AlphaInotech Corporation®

⁶ AlphaeasyFC Software- AlphaInotech Corporation®

em frasco de poliestireno foi inserido em uma estação de trabalho DNA Workstation Loccus Biotecnologia – Loccus do Brasil Ltda, São Paulo, SP, submetido a uma radiação uv de 6,24 J/mL, em comprimento de onda de 256 nm em ambos os lados do frasco em temperatura ambiente. A radiação foi realizada em 30 sessões de 90 segundos. No intervalo de cada sessão, o sangue era homogeneizado lentamente durante 60 segundos, de modo que toda amostra recebesse a mesma quantidade de radiação. Após esse procedimento, o conteúdo da bolsa foi dividido de modo que cada bezerro a ser inoculado recebesse uma alíquota de 50 mL de sangue.

3.10. Pesquisa de esporocinetos em hemolinfa

Após o término do experimento, carrapatos presentes nos bovinos pertencentes aos grupos III, IV e V foram coletados para a pesquisa de esporocinetos de *Babesia bigemina* conforme técnica descrita por Quintão-Silva e Ribeiro (2003).

A hemolinfa foi obtida a partir da secção da porção distal de uma das pernas de fêmeas ingurgitadas que parasitavam os bezerros, após um período de oito dias de incubação em estufa a $27 \pm 0,5^\circ \text{C}$, a uma umidade relativa de 80-90%. Os esfregaços foram realizados em lâminas de vidro, corados pela técnica de Giemsa e examinados em microscópio óptico sob imersão. As análises foram repetidas diariamente do oitavo ao 14º dia de incubação. O objetivo dessa técnica foi realizar a identificação de esporocinetos de *Babesia bigemina* na hemolinfa de carrapatos que infectavam os animais do experimento.

Essa técnica pode ser utilizada para auxiliar no diagnóstico da babesiose. (QUINTÃO-SILVA E RIBEIRO, 2003).

3.11. Análises Estatísticas

A comparação das medidas dos resultados dos parâmetros obtidos entre os grupos foi realizada por meio do teste t para amostras independentes e a comparação dos valores entre o momento inicial e final do estudo foi realizada por meio do teste t para amostras pareadas. Os valores de $p < 0,01$ foram

considerados estatisticamente significativos das medidas médias entre os grupos comparados. Os perfis de médias auxiliam na interpretação dos dados. As análises foram realizadas de acordo com Bussab e Moretin (2002) e Morgan et al. (2004)

3.12. Comitê de Ética

Antes da realização desta pesquisa, o projeto deste experimento foi submetido ao comitê de ética para uso de animais da FMVZ-UNESP sob o número do protocolo 75/2009 – CEUA.

3.13. Projeto FAPESP:

Este experimento foi realizado com recursos do Auxílio à Pesquisa e concessão de Bolsa de Doutorado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, número dos processos: 09/52398-2 e 09/51737-8.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo das análises estatísticas realizadas pode ser visualizadas no quadro 11 do anexo.

4.1. Primeira etapa

4.1.1. Contagem total de hemácias

As variações dos valores médios do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) e desvio padrão de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses, provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 dos Grupos I (Hígido) e II (*Babesia bigemina*) estão descritos na tabela 1. Houve uma redução significativa ($p < 0.01$) dos valores médios do número total de hemácias no decorrer do tempo nos dois grupos. No grupo I, no primeiro dia (dia 0) de análise foi encontrado um valor médio de $6,19 \times 10^6 \pm 359,7$ (hemácias por mm^3). Estes valores reduziram para $4,58 \times 10^6 \pm 296,8$ (hemácias/ mm^3) após 21 dias de conservação. Houve diferença estatística entre os comportamentos dos grupos I e II. No grupo parasitado houve uma redução mais acentuada do número de hemácias.

Tabela 1. Variação dos valores médios da contagem total de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) e desvio padrão de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, $n=8$) e Grupo II (*Babesia bigemina*, $n=8$).

DIA	GRUPO I	DESVIO PADRÃO	GRUPO II	DESVIO PADRÃO
DIA 0	6,19 ^a	$\pm 359,66$	2,12 ^c	$\pm 266,40$
DIA 3	6,14	$\pm 410,50$	2,01	$\pm 394,20$
DIA 6	5,93	$\pm 1127,03$	2,07	$\pm 277,32$
DIA 9	5,02	$\pm 853,78$	1,47	$\pm 351,41$
DIA 12	5,17	$\pm 718,01$	0,79	$\pm 177,68$
DIA 15	4,83	$\pm 460,19$	1,04	$\pm 483,81$
DIA 18	4,77	$\pm 445,13$	0,91	$\pm 481,28$
DIA 21	4,58 ^b	$\pm 296,83$	0,94 ^d	$\pm 530,63$

≠ ab: $p < 0,01$; ≠ cd: $p < 0,01$

Os animais do grupo II apresentaram anemia já no primeiro dia de análise. Esta é uma das alterações mais comumente encontradas em animais com babesiose (MENDONÇA, 2003; BAZAN, 2008). A variação dos valores médios do grupo II (*Babesia bigemina*) foi de $2,11 \times 10^6 \pm 266,4$ (hemácias/

mm³) no primeiro dia diminuindo para $0,94 \times 10^6 \pm 530,6$ (hemácias/ mm³) no dia 21. Os valores médios verificados no grupo parasitado foram significativamente inferiores que do grupo hígido ($p < 0,01$) (Tabela 1).

A variação dos valores médios do número de hemácias dos grupos I (Hígido) e II (*Babesia bigemina*) pode ser visualizada na Figura 1 e quadro 11.

A redução do número de hemácias no decorrer do período de conservação ocorreu provavelmente devido à hemólise, alteração que pode ter sido provocada pelas lesões de estocagem. O plasma contido nas bolsas apresentava coloração avermelhada confirmando esta alteração. Estes resultados encontram-se de acordo com as alterações encontradas por Ribeiro Filho et al. (1994), Almosny et al. (2000), Fischer et al. (2004), Bazan (2008) e Souza et al. (2009).

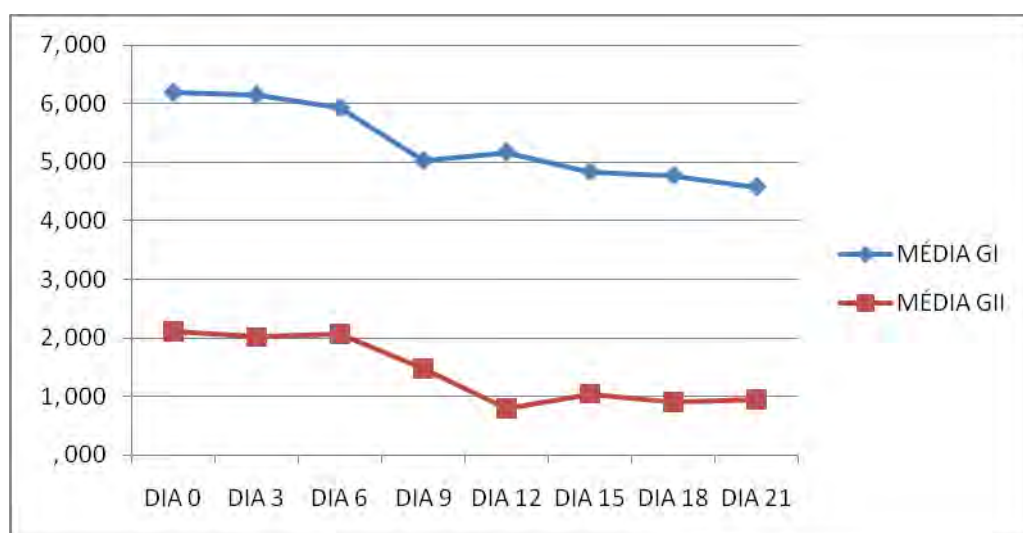


Figura 1. Variação dos valores médios do número de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (hígido/média GI, $n=8$) e Grupo II (*Babesia bigemina*/média GII, $n=8$).

4.1.2 Concentração da Hemoglobina

Foi verificada uma redução dos valores médios da Concentração de Hemoglobina do grupo I. Os valores médios encontrados no primeiro dia foram de $10,1 \pm 1,8$ (g/dL) que diminuiram para $8,7 \pm 0,6$ (g/dL) no dia 21 (tabela 2). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas no grupo parasitado, em que foi encontrada uma média de $3,1 \pm 0,3$ (g/dL) no primeiro dia e uma média de $3,2 \pm 0,4$ (g/dL) no último dia de análise (Tabela 2).

Tabela 2. Variação dos valores médios da Concentração da Hemoglobina (g/dL) e desvio padrão de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, n=8).

DIA	GRUPO I	DESVIO PADRÃO	GRUPO II	DESVIO PADRÃO
DIA 0	10,11 ^a	1,83	3,13 ^c	0,32
DIA 3	9,80	0,65	3,14	0,43
DIA 6	10,06	1,13	3,20	0,35
DIA 9	10,05	0,77	3,23	0,20
DIA 12	8,69	0,66	3,14	0,22
DIA 15	8,60	0,48	3,34	0,42
DIA 18	8,86	0,42	3,39	0,42
DIA 21	8,74 ^b	0,57	3,24 ^c	0,38

≠ ab: p<0,01; ~cc: p=0,259

A variação dos valores médios da Concentração da Hemoglobina do grupo I (hígido) e grupo II (*Babesia bigemina*) pode ser visualizada na Figura 2.

A redução da Concentração da Hemoglobina no decorrer do tempo ocorreu provavelmente devido às lesões de estoque, principalmente a desnaturação de proteínas que ocorre em sangue conservado em bolsas para transfusão contendo CPDA-1. Estes resultados estão de acordo com os valores encontrados por Ribeiro Filho et al. (1994), Almosny et al.(2000) e Fischer et al. (2004).

Não houve variação na média da Concentração da Hemoglobina do grupo II, provavelmente porque o animal doador do sangue para a conservação já apresentava baixos valores da concentração da hemoglobina no primeiro dia de análise.

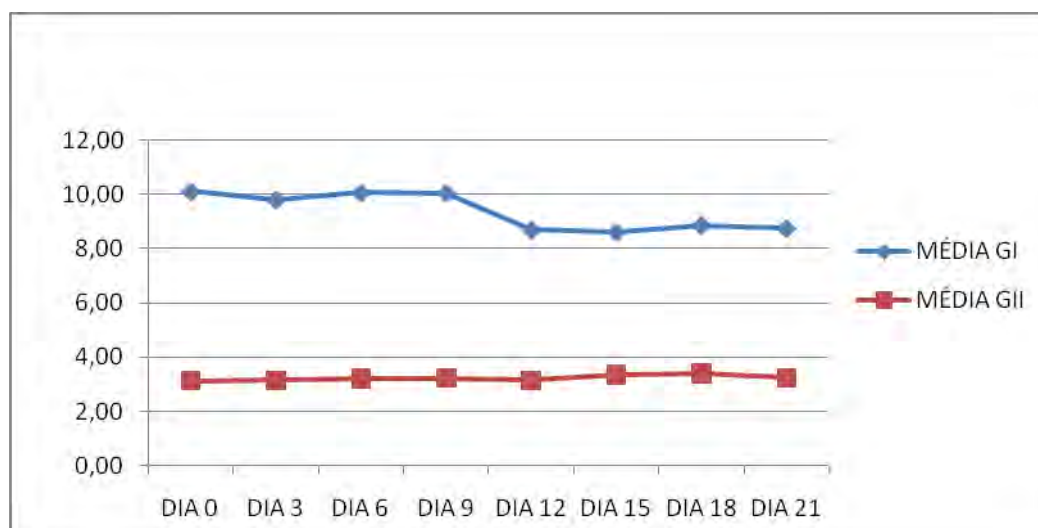


Figura 2. Variação dos valores médios da Concentração da Hemoglobina (g/dL) de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, média GI, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, média GII, n=8).

4.1.3. Volume Globular (hematócrito)

Foi verificada uma redução dos valores de Volume Globular no grupo I ($p < 0,01$). No primeiro dia de análise das bolsas do grupo I (hígido) foi encontrada uma média de 30 ± 3 (%) que foi reduzida para $24 \pm 0,5$ (%) após 21 dias (tabela 3). Já no grupo parasitado, as médias variaram de $12 \pm 2,2$ (%) para $10 \pm 0,5$ (%) (tabela 3). Novamente foi observada uma diferença estatística entre os grupos I e II ($p < 0,01$).

Tabela 3. Variação dos valores médios de Volume Globular (%) e desvio padrão de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, n=8).

DIA	GRUPO I	DESVIO PADRÃO	GRUPO II	DESVIO PADRÃO
DIA 0	30 ^a	3,40	12 ^c	2,20
DIA 3	28	1,96	11	1,25
DIA 6	25	1,99	10	1,16
DIA 9	25	1,19	10	0,53
DIA 12	25	0,99	10	0,74
DIA 15	24	1,07	10	0,53
DIA 18	24	0,74	10	0,53
DIA 21	24 ^b	0,52	10 ^c	0,52

≠ ab: $p < 0,01$; ~cc: $p = 0,10$

A variação dos valores médios do Volume Globular do grupo I (hígido) e grupo II (*Babesia bigemina*) pode ser visualizada na Figura 3.

Assim como foi observado na contagem total de hemácias, houve uma redução do Volume Globular no decorrer do tempo ocorreu provavelmente devido à hemólise que acontece em sangue conservado em bolsas para transfusão contendo CPDA-1, decorrente de lesões de estocagem. Estes resultados estão de acordo com os valores encontrados por Ribeiro Filho, (1994); Almosny et al.,(2000) e Fischer et al. (2004).

Em situação semelhante à observada na Concentração da Hemoglobina, os valores médios do Volume globular das bolsas do grupo II não tiveram diferenças significativas em relação ao período inicial e final de análise. Isso ocorreu provavelmente porque o animal doador do sangue para a conservação já apresentava baixos valores da concentração da hemoglobina no primeiro dia de análise.

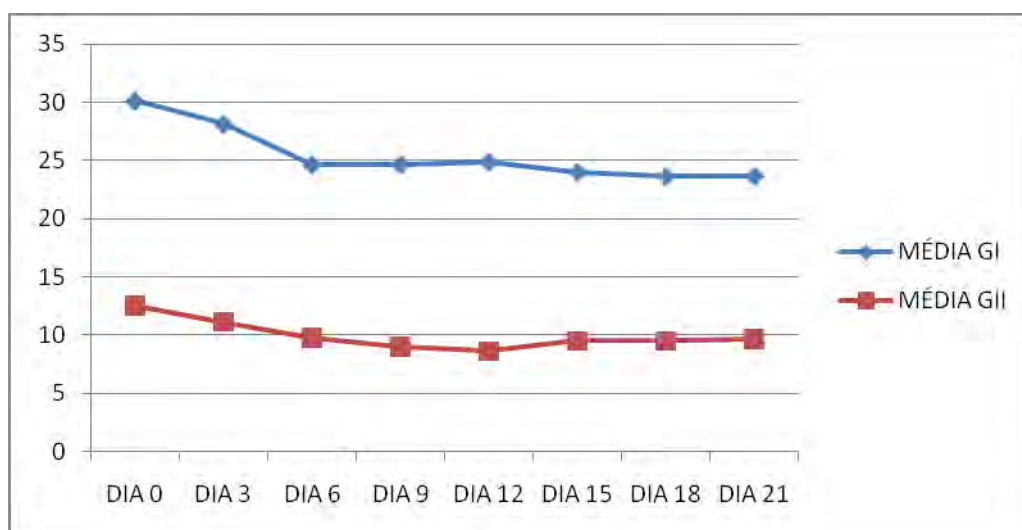


Figura 3. Variação dos valores médios de Volume Globular (%) de sangue bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, média GI, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, média GII, n=8).

4.1.4. Proteína Plasmática Total

A concentração da Proteína Plasmática Total do grupo I reduziu no período de estocagem. No dia 0, os valores médios encontrados foram de $6,5 \pm 0,4$ (g/dL), que decaíram para $5,7 \pm 0,2$ (g/dL) no último dia de análise ($p < 0,01$) (tabela 4). Não foi observada diferença estatística significativa nas

análises realizadas no grupo II, em que foram encontradas médias de $3,7 \pm 0,2$ (g/dL) no dia 0 e $3,7 \pm 0,4$ no dia 21. Foram encontrados valores de Proteína Plasmática Total no grupo II significativamente menores que no grupo controle ($p < 0.01$) (tabela 4).

Tabela 4. Variação dos valores médios de Proteína Plasmática Total (g/dL) e desvio padrão em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, n=8).

DIA	GRUPO I	DESVIO PADRÃO	GRUPO II	DESVIO PADRÃO
DIA 0	6,5 ^a	0,40	3,7 ^c	0,19
DIA 3	6,6	0,17	3,9	0,14
DIA 6	5,4	0,15	3,6	0,29
DIA 9	5,7	0,15	3,7	0,26
DIA 12	5,3	0,18	3,9	0,15
DIA 15	5,6	0,09	3,7	0,21
DIA 18	5,3	0,15	3,8	0,30
DIA 21	5,7 ^b	0,15	3,7 ^c	0,35

≠ ab: $p < 0,01$; ~cc: $p = 0,867$

A variação dos valores médios de Proteína Plasmática Total do grupo I (Hígido) e II (*Babesia bigemina*) pode ser visualizada na Figura 4.

A queda dos valores da Proteína Plasmática Total no início do período de conservação foi decorrente da hemoparasitose presente no animal doador do sangue para as bolsas do grupo II. Estes resultados são semelhantes aos verificados por Ribeiro Filho et al. (1994). Durante o período de armazenamento ocorre uma desnaturação de proteínas plasmática devido à redução do pH que acontece no decorrer do tempo (CAIRUTAS, 1985). O aumento da acidez do plasma promove desnaturação protéica no interior da bolsa (RIBEIRO FILHO et al., 1994; COSTA JÚNIOR, 2006).

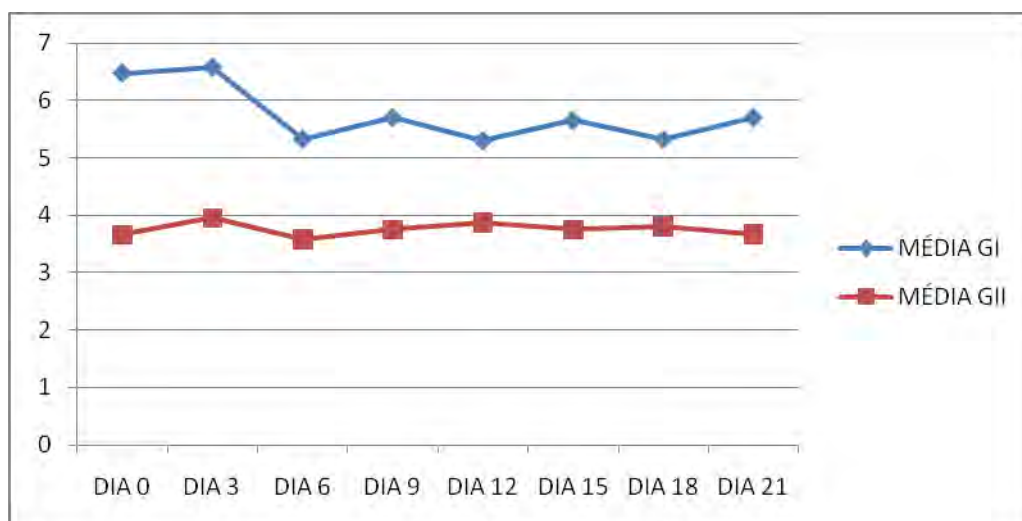


Figura 4. Variação dos valores médios de Proteína Plasmática Total (g/dL) em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido/Média GI, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*/média GII, n=8).

4.1.5. Fibrinogênio Plasmático

As determinações de Fibrinogênio Plasmático do grupo I tiveram média de $450 \pm 141,4$ (mg/dL) que, ao final do experimento, mostrou uma redução para $300 \pm 106,9$ (mg/dL), não apresentando uma diferença estatística significativa entre os períodos analisados, $p=0,014$ (tabela 5). Já no grupo II, houve uma redução significativa destes valores ($p<0,01$). No primeiro dia foi encontrada uma média de $500 \pm 106,9$ (mg/dL), enquanto no dia 21 foi encontrada uma média de $250 \pm 92,6$ (mg/dL) (tabela 5). Houve diferença significativa entre os grupos I e II. Como houve uma tendência de queda dos valores de fibrinogênio plasmático do grupo I, talvez essa redução se tornasse mais evidente se fosse analisado um período maior de conservação.

Tabela 5. Variação dos valores médios de Fibrinogênio (mg/dL) e desvio padrão em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, n=8).

DIA	GRUPO I	DESVIO PADRÃO	GRUPO II	DESVIO PADRÃO
DIA 0	450 ^a	141,4	500 ^b	106,9
DIA 3	375	70,7	525	103,5
DIA 6	375	70,7	550	92,6
DIA 9	350	92,6	550	141,4
DIA 12	350	92,6	500	106,9
DIA 15	300	106,9	300	151,2
DIA 18	300	106,9	325	183,2
DIA 21	300 ^a	106,9	250 ^c	92,6

~aa: p=0,014; ≠ bc: p<0,01

A variação dos valores médios de Fibrinogênio Plasmático do grupo I (Hígido) e grupo II (*Babesia bigemina*) pode ser visualizada na Figura 5.

Provavelmente, houve desnaturação do fibrinogênio devido ao acúmulo de íons H⁺ que ocorre no interior da bolsa no decorrer do tempo. Devido à retirada do sangue da circulação, o metabolismo das células gera uma redução do pH, principalmente por causa da metabolização da glicose em lactato, levando a um acúmulo de íons H⁺, conforme citado por Ribeiro Filho et al. (1994) e Costa Júnior (2006).

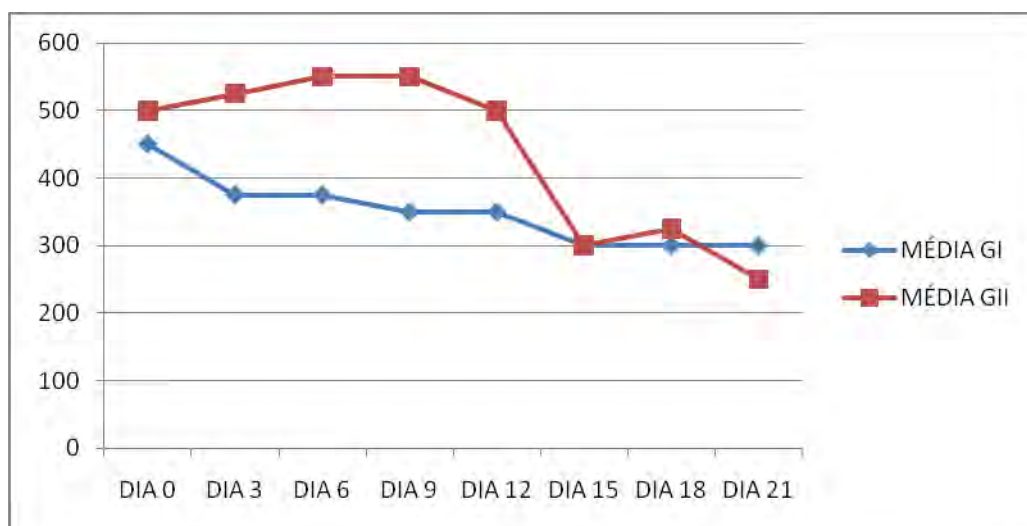


Figura 5. Variação dos valores médios de Fibrinogênio (mg/dL) em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, média GI, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, média GII, n=8).

4.1.6. Contagem total de leucócitos

Houve uma redução dos valores do número total de leucócitos em ambos os grupos analisados. O grupo I apresentou uma média de $15198,8 \pm 1778,14$ (leucócitos/mm³) no primeiro dia de análise. Esses valores reduziram para $8942,5 \pm 2557,55$ no dia 21 ($p < 0,01$) (tabela 6). Já no grupo II houve uma redução de $19962,5 \pm 1778,1$ (leucócitos/mm³) para $10883,8 \pm 986,1$ no último dia ($p < 0,01$) (tabela 6). Não houve diferença significativa entre os dois grupos analisados.

Tabela 6. Variação dos valores médios da Contagem total de leucócitos (leucócitos/ μ L) de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, n=8).

DIA	GRUPO I	DESVIO PADRÃO	GRUPO II	DESVIO PADRÃO
DIA 0	15198,7 ^a	1778,14	19962,5 ^c	4728,32
DIA 3	14555,0	2633,95	16037,5	3874,80
DIA 6	13195,0	2172,18	14787,5	3146,60
DIA 9	12270,0	1438,97	13976,2	2681,10
DIA 12	11085,0	2192,21	12553,7	2018,00
DIA 15	9837,5	2905,14	11858,7	1163,60
DIA 18	9550,0	2788,38	11375,0	1282,60
DIA 21	8942,5 ^b	2557,56	10883,75 ^d	986,10

≠ ab: $p < 0,01$; ≠ cd: $p < 0,01$

A variação dos valores médios do número total leucócitos dos grupos I (Hígido) e II (*Babesia bigemina*) pode ser visualizada na Figura 6.

Esses dados corroboram a pesquisa realizada por Ribeiro Filho et al. (1994): sangue bovino conservado em bolsas apresenta uma redução do número de leucócitos no decorrer do tempo. Isso acontece principalmente devido à degranulação de polimorfonucleares. Esses resultados são semelhantes aos verificados por Salib e Dawson (1985), em sangue de búfalos, que também descrevem a degranulação de polimorfonucleares como a principal causa da redução do contagem total de leucócitos em sangue conservado para transfusão.

Segundo Ribeiro Filho et al. (1994) a presença de crioglobulinas, criofibrinogênio, plaquetas acumuladas e fibrinas da coagulação podem ser contadas como leucócitos em contadores automáticos. Por isso, os valores

encontrados foram maiores do que os valores de referência (RIBEIRO FILHO, 1992).

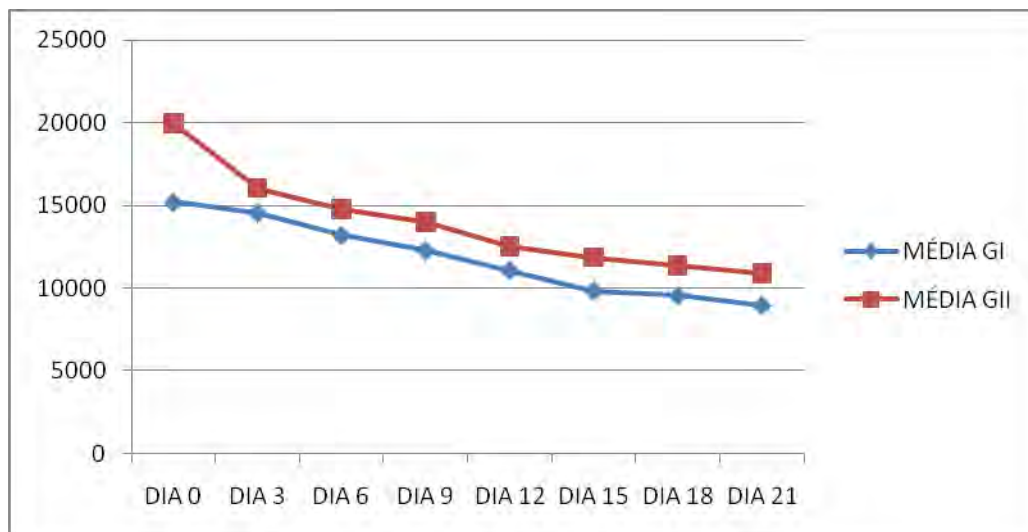


Figura 6. Variação dos valores médios da contagem total de leucócitos (leucócitos/ μ L) de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, média GI, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, média GII, n=8).

4.1.7. Concentração de Sódio Plasmático

Os valores médios de sódio plasmático reduziram no decorrer do período de observação. No grupo I, as concentrações deste íon no primeiro dia de análise apresentavam média de $200,9 \pm 23,9$ (mg/dL). Estes valores reduziram para $172,4 \pm 23,1$ (mg/dL) após 21 dias de análise (tabela 7). Situação semelhante ocorreu nas concentrações plasmáticas de sódio do grupo II. Ocorreu uma redução de $171,5 \pm 12,4$ (mg/dL) para $138,1 \pm 13,1$ (mg/dL) (tabela 7). Não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,003$). A variação dos valores médios de sódio do grupo I (hígido) e do grupo II (*Babesia bigemina*) pode ser visualizada na Figura 7.

Tabela 7. Variação dos valores médios de Sódio (mg/dL) em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, n=8).

DIA	GRUPO I	DESVIO PADRÃO	GRUPO II	DESVIO PADRÃO
DIA 0	200,9 ^a	23,89	171,5 ^c	12,42
DIA 3	193,4	19,75	167,0	13,89
DIA 6	188,9	19,36	164,1	12,91
DIA 9	186,5	19,62	157,4	9,74
DIA 12	184,88	19,69	153,1	9,46
DIA 15	181,0	21,95	147,8	12,16
DIA 18	176,1	22,27	143,6	12,07
DIA 21	172,4 ^b	23,11	138,1 ^d	13,11

≠ ab: p<0,01; ≠ cd: p<0,01

A redução do sódio se deve à diminuição dos níveis de ATP disponíveis no plasma da bolsa. Com isso, ocorre uma diminuição da atividade da enzima Sódio/Potássio ATPase. Ocasionalmente um acúmulo de sódio no meio intracelular, reduzindo sua concentração livre no plasma. Estes dados estão de acordo com os resultados verificados por Ribeiro Filho et al. (1994).

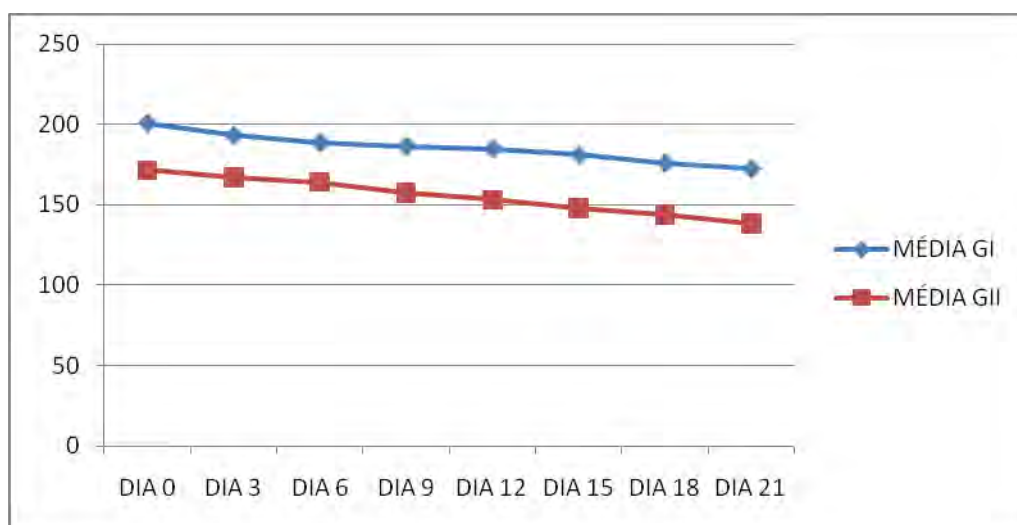


Figura 7. Variação dos valores médios de Sódio (mg/dL) em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, média GI, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, média GII, n=8).

4.1.8. Concentração de Potássio Plasmático

Ambos os grupos apresentaram elevação significativa das concentrações plasmáticas de potássio (p<0,01). No grupo I, foi determinada uma concentração média de potássio de 4,0±0,3 (mg/dL) no dia zero, que

aumentou no decorrer do tempo, atingindo valores de $6,0 \pm 0,9$ no dia 21 (tabela 8). Situação semelhante ocorreu no grupo II, em que os valores médios variaram de $3,0 \pm 0,4$ a $4,2 \pm 0,3$ (mg/dL) (tabela 8).

Tabela 8. Variação dos valores médios de Potássio (mg/dL) de bezerros mestiços, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, n=8).

DIA	GRUPO I	DESVIO PADRÃO	GRUPO II	DESVIO PADRÃO
DIA 0	4,0 ^a	0,30	3,0 ^c	0,37
DIA 3	4,3	0,30	3,1	0,41
DIA 6	4,5	0,30	3,4	0,37
DIA 9	4,8	0,40	3,5	0,37
DIA 12	5,3	0,40	3,6	0,44
DIA 15	5,6	0,70	3,9	0,41
DIA 18	5,8	0,70	4,1	0,41
DIA 21	6,0 ^b	0,90	4,2 ^c	0,33

≠ ab: $p < 0,01$; ~cc: $p > 0,001$

A variação dos valores médios de potássio dos grupos I (Hígido) e II (*Babesia bigemina*) pode ser visualizada na Figura 8.

O aumento do potássio no plasma ocorreu possivelmente devido à presença deste íon na solução preservadora, ao tempo de conservação, à atividade da enzima de Na/K ATPase e à hemólise. O rompimento da hemácia promove a liberação dos íons presente no interior dessa célula. Os resultados observados neste experimento estão de acordo com os de Ribeiro Filho et al. (1994) e Michael (1975), em que foi verificado o aumento das concentrações de potássio plasmático durante o período de conservação.

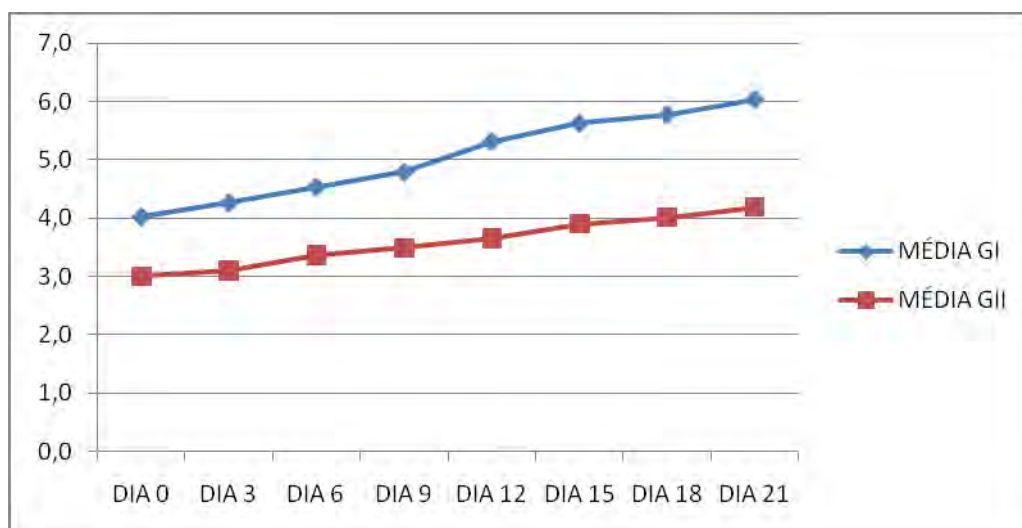


Figura 8. Variação dos valores médios de Potássio (mg/dL) de bezerros mestiços, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, média GI, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, média GII, n=8).

4.1.9. Concentração de Lactato Plasmático

Foi verificado um aumento estatístico significativo dos níveis plasmáticos de lactato nas bolsas de sangue do grupo I ($p < 0,01$). No primeiro dia de análise foi observado um valor médio de $4,0 \pm 0,3$ (mg/dL). Essa média elevou para $15,4 \pm 4,1$ (mg/dL) após 21 dias de conservação (Tabela 9). Por outro lado, as médias do grupo parasitado não se alteraram após 21 dias de análise: $19,9 \pm 1,3$ (mg/dL) e $19,9 \pm 1,0$ (mg/dL), respectivamente (Tabela 9). Esses dados mostram uma diferença no comportamento dos grupos I e II. Foi verificado que as bolsas de sangue do grupo II já apresentavam níveis de lactato elevados desde o primeiro dia de análise. Possivelmente, a hemoparasitose contribuiu para a elevação das concentrações plasmáticas de lactato.

Tabela 9. Variação dos valores médios de Lactato (mg/dL) de bezerros mestiços, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, n=8).

DIA	GRUPO I	DESVIO PADRÃO	GRUPO II	DESVIO PADRÃO
DIA 0	3,95 ^a	0,89	19,9 ^c	1,28
DIA 3	6,48	0,69	20,7	0,63
DIA 6	13,40	3,15	21,8	3,07
DIA 9	15,29	4,84	23,2	3,65
DIA 12	14,13	2,21	20,7	1,16
DIA 15	14,54	3,77	21,8	4,76
DIA 18	16,47	1,96	20,5	1,70
DIA 21	15,41 ^b	4,12	19,9 ^c	1,00

≠ ab: p<0,01; ~cc: p>0,001

A variação dos valores médios de lactato do grupo I (Hígido) e grupo II (*Babesia bigemina*) pode ser visualizada na Figura 9.

As bolsas de sangue de bovinos hígidos (grupo I) apresentaram aumento dos níveis de lactato plasmático com o decorrer do período de conservação. Estes resultados estão de acordo com encontrados por Costa Júnior (2006). Esse aumento ocorreu devido ao metabolismo da glicose presente na bolsa de sangue contendo CPDA-1. O acúmulo do lactato é o principal responsável pela redução do pH no interior da bolsa. As bolsas de sangue proveniente de bovinos parasitados com *B. bigemina* já apresentavam elevados níveis de lactato no primeiro momento de análise. Talvez esta seja uma alteração pertinente da babesiose, pois em estudo feito por Rickard (1970) o sangue de ratos infectados com *Babesia rodhaini* apresentou elevada concentração de lactato devido ao maior consumo de frutose e maltose que ocorreu em razão da hemoparasitose.

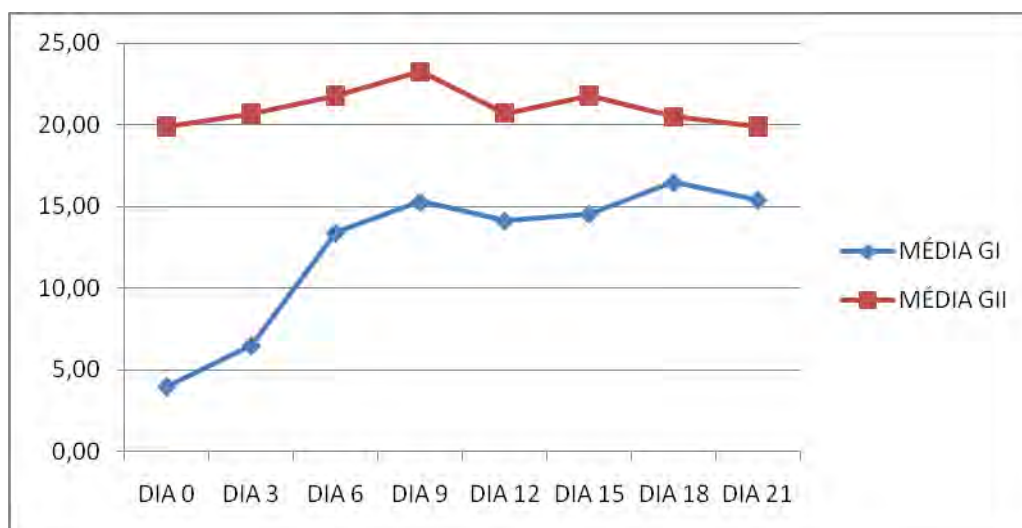


Figura 9. Variação dos valores médios de Lactato (mg/dL) em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo I (Hígido, média GI, n=8) e Grupo II (*Babesia bigemina*, média GII, n=8).

4.2 Segunda Etapa

4.2.1. Esfregaço Sanguíneo Corado (parasitemia)

O animal utilizado como doador do sangue para a primeira etapa do experimento apresentou uma parasitemia de 1% no dia da irradiação. Após o tratamento com riboflavina/UV esse sangue foi inoculado nos animais da segunda etapa do experimento. O grau de parasitemia obtido nos animais inoculados está apresentado na tabela 10.

Tabela 10. Grau de parasitemia de *Babesia bigemina* no sangue coletado de bezerros mestiços dos grupos III (n=2), IV (n=3) e V (n=3). Análises realizadas 7, 14 e 21 dias após a inoculação.

GRUPOS	AOS 7 DIAS APÓS INOCULAÇÃO	AOS 14 DIAS APÓS INOCULAÇÃO	AOS 21 DIAS APÓS INOCULAÇÃO
GRUPO III (E.N.T)	50% (0, 001)	50% (0, 001)	100% (-)
GRUPO IV (H.T.)	100% (-)	100% (-)	33% (0, 001)
GRUPO V (E.T.)	100% (-)	33% (0, 001)	100% (-)

Legenda:

E.N.T.: Bezerros Esplenectomizados que receberam sangue não Tratado;

H.T.: Bezerros Hígidos que receberam sangue Tratado;

E.T.: Bezerros Esplenectomizados que receberam sangue Tratado;

(+) = Parasitemia positiva

(-) = Parasitemia negativa

Os resultados do esfregaço corado em lâminas demonstraram uma redução do grau de parasitemia no decorrer do tempo. Essa diminuição pode

ter ocorrido pelo período de armazenamento do sangue. Porém, é importante ressaltar que a sensibilidade desta técnica é baixa. Assim, é possível que o parasita estivesse presente no animal e não tenha sido possível a sua observação. Outro fator importante é que dificilmente o parasita é visualizado em lâmina na fase aguda da doença. Esses dados estão de acordo com Krause et al. (1996), Martins (1996), Mendonça et al. (2003) e Pereira (2006), que ainda citam a necessidade de que vários esfregaços sanguíneos corados devam ser examinados para a identificação de *Babesia bigemina*, já que menos de 1% dos eritrócitos estão parasitados na primeira semana da enfermidade.

4.2.2. Reação de Imunofluorescência Indireta

Os resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta realizada no sangue de bezerro parasitado com *Babesia bigemina* antes e após o tratamento com Riboflavina associada à Luz ultravioleta foram positivos.

Esses resultados mostram que a alíquota de sangue proveniente da bolsa que foi armazenada por 21 dias apresentava anticorpos contra *Babesia bigemina*, e que a técnica de inativação de patógenos da Riboflavina associada à irradiação ultravioleta não alterou os anticorpos presentes na alíquota de sangue.

Tabela 11. Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detectar anticorpos contra *Babesia bigemina* no sangue coletado de bezerros mestiços dos grupos III (n=2), IV (n=3) e V (n=3). Análises realizadas 7, 14 e 21 dias após a inoculação.

GRUPOS	AOS 7 DIAS APÓS INOCULAÇÃO	AOS 14 DIAS APÓS INOCULAÇÃO	AOS 21 DIAS APÓS INOCULAÇÃO
GRUPO III (E.N.T.)	100% (-)	50% (+)	50% (+)
GRUPO IV (H.T.)	50% (+)	100% (+)	75% (+)
GRUPO V (E.T.)	33% (+)	100% (-)	100% (+)

Legenda: E.N.T.: Animais Esplenectomizados que receberam sangue Não Tratado;

H.T.: Animais Hígidos que receberam sangue Tratado;

E.T.: Animais Esplenectomizados que receberam sangue Tratado.

(+) = RIFI positiva

(-) = RIFI negativa

Os resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta mostram que os animais apresentaram anticorpos contra *Babesia bigemina* a partir de 14

dias após a inoculação. Isso se deve ao fato que o organismo do animal teve um determinado período de tempo para produzir anticorpos contra o parasita. É importante ressaltar que os animais considerados positivos na RIFI foram aqueles que apresentaram titulação maior que 1/320, demonstrando que esses animais apresentavam uma infecção no momento da análise e não anticorpos de infecções prévias. Três semanas após a inoculação, todos os animais apresentaram anticorpos contra a doença. O confronto das diversas técnicas de diagnóstico para a babesiose realizadas neste estudo comprovou grande sensibilidade da Reação de Imunofluorescência Indireta na detecção de anticorpos anti*Babesia bigemina*. Esses dados estão de acordo com os verificados por Martins et al. (1996). Demonstram ainda que o tratamento da riboflavina associada com a ultravioleta não foi eficaz na inativação de *Babesia bigemina*.

4.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase (qPCR ou PCR em tempo real)

Os resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta realizada no sangue de bezerro parasitado com *Babesia bigemina* antes e após o tratamento com Riboflavina associada à Luz ultravioleta foram negativos.

Os resultados evidenciam que a técnica de PCR não identificou fragmentos de DNA de *Babesia bigemina* nas amostras analisadas. Estes resultados contrastam com os resultados obtidos por Pereira (2006) e Buling et. al. (2007), que demonstram uma alta sensibilidade da técnica de qPCR. Segundo Krause et al. (1996), resultados negativos na PCR não significa que as bolsas de sangue conservado não apresentavam o parasita, mas pode ser devido à pequena quantidade de sangue de 0,5 mL utilizada na técnica de PCR.

Tabela 12. Reação em Cadeia da Polimerase em sangue coletado de bezerros mestiços dos grupos III (n=2), IV (n=3) e V (n=3). Avaliação dos

animais 7, 14 e 21 dias após a inoculação do sangue parasitado com *Babesia bigemina*.

GRUPO	AOS 7 DIAS APÓS INOCULAÇÃO	AOS 14 DIAS APÓS INOCULAÇÃO	AOS 21 DIAS APÓS INOCULAÇÃO
GRUPO III (E.N.T.)	50% (+)	50% (+)	50% (+)
GRUPO IV (H.T.)	100% (+)	66% (+)	100% (+)
GRUPO V (E.T.)	100% (-)	100% (-)	100% (-)

Legenda: E.N.T.: Animais Esplenectomizados que receberam sangue Não Tratado;

H.T.: Animais Hígidos que receberam sangue Tratado;

E.T.: Animais Esplenectomizados que receberam sangue Tratado.

(+) = qPCR positiva

(-) = qPCR negativa

Apenas um animal adoeceu durante a segunda fase do experimento. Esse achado está de acordo com dados de Vidotto e Marana, 2001; Resende e Petroianu, 2002, que relatam que animais esplenectomizados são mais suscetíveis a infecções. A maioria dos animais deste experimento não adoeceu. Isso ocorreu provavelmente devido ao fato de terem sido utilizados animais mestiços da raça Nelore, que é mais resistente a infecções por hemoparasitas do que raças taurinas. Outro fator importante a ser relatado é que alguns animais, sobretudo animais indianos, apresentam mecanismos de inespecíficos de resistência à *Babesia bigemina* pois, segundo Kessler, (1983), nestes animais pode ocorrer um controle da parasitemia mesmo antes da formação de anticorpos contra esse protozoário.

4.2.4. Pesquisa de esporocinetos em hemolinfa

Não foram observados esporocinetos em esfregaços corados confeccionados a partir da hemolinfa dos carrapatos que parasitavam os animais deste experimento. Isto ocorreu provavelmente devido à baixa parasitemia encontrada nos bezerros deste experimento.

5. CONCLUSÕES

Nas condições que este experimento foi realizado é possível concluir que:

5.1. Conclusões da Primeira etapa do experimento

A estocagem de sangue bovino conservado em CPDA-1 por 21 dias em temperatura de 4 a 8°C promoveu:

5.1.1. A Redução do número total de hemácias e leucócitos, do Volume Globular, da Concentração da Hemoglobina, da Proteína Plasmática Total, do Fibrinogênio e do Sódio.

5.1.2. O aumento da concentração plasmática de Potássio e do Lactato.

A presença de *Babesia bigemina* eleva a concentração de lactato no sangue conservado em CPDA-1.

5.1.3. O sangue mantém suas características de viabilidade.

5.2. Conclusões da segunda etapa do experimento

5.2.1 O tratamento com a associação da Riboflavina com a Radiação Ultravioleta não demonstrou eficácia na eliminação da *Babesia bigemina*.

5.2.2 A técnica de inativação de patógenos da Riboflavina associada à radiação ultravioleta não danificou os anticorpos contra *Babesia bigemina* presentes nas bolsas de sangue conservadas para transfusão.

5.2.3 A qPCR não detectou fragmentos de DNA de *Babesia bigemina* nas amostras analisadas.

5.2.4 Apesar dos resultados obtidos neste estudo. A técnica da Riboflavina associada à radiação ultravioleta demonstra um grande potencial a ser explorada devido ao seu baixo custo, facilidade de execução e baixa toxicidade ao receptor. Novos estudos devem ser realizados no intuito de verificar a

eficácia desta técnica na redução, inativação ou eliminação completa de diversos patógenos que podem ser transmitidos por meio da transfusão sanguínea.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A.A.; MANGOLD, A.J.; TORIONI, S. Control y erradicacion de la anaplasmosis en un rodeo lechero. *Vet. Argent.*, v.15, n.145, p.341-346, 1998.
- Almeida, M.B.; Tortelli, F.P.; Riet-Correa, B.; Ferreira, J.L.M.; Soares, M.P.; Farias, N.A.R.; Riet-Correa, F.; Schild, AL. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. *Pesq. Vet. Bras.* v. 26, n.4, p. 237-242, 2006.
- ALMOSNY, N.R.P.; SOARES, F.M.D.; CARDOSO, A.; VASCONCELOS, T.C.; MONTEIRO, A.O. Avaliação da deficiência eritrocitária da glicose-6-fosfato desidrogenase e valores hematológicos de equinos de salto. *Rev. Bras. Ciênci. Vet.*, v.7, n.1, p.14-16, 2000.
- ALVES, G.E.S.; SILVA, R.B. DA; SANTOS FILHO, H.A.; LAZZERI, L.; SANTOS, E.S.; BETEILLE, P.R.B. Esplenectomia em bovino. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Brazil)*. v. 7, n.2, p. 135-138, 1984.
- ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; SOARES, C.O.; KESSLER, R.H. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.23, n.4, p.139-148, 2003.
- BAZAN, C.T.; CAMARGO, G.O.A.; SANTOS, M.A. Babesiose bovina. *Rev. Eletrôn. Méd. Vet.*, n.11, 2008.
- BOSE, R.; JORGENSEN, W.K.; DALGLIESH, R.J.; FRIEDHOFF, K.T.; DEVOS, A.J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.*, n.57, p.61-74, 1995.
- BRYANT, B.J.; KLEIN, H.G. Pathogen Inactivation: the definitive safeguard for the blood supply. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.131, n.5, p.719-733, 2007.
- BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ASENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBACARRETERO, J.C.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol.*, v.147, p.16-25, 2007.
- BUSSAB, W.; MORETIN, P. *Estatística básica*. 5.ed. São Paulo: Saraiva, 2002. 526p.

- CALLAHAN, S.M.; WONGANAN, P.; OBENAUER-KUTNER, L.J.; SUTJIPTO, S.; DEKKER, J.D.; CROYLE, M.A Controlled inactivation of recombinant viruses with vitamin B2. *J. Virol. Methods*, n.148, p.132-145, 2008.
- CAIRUTAS, G.M. *Componentes e derivados do sangue para uso terapêutico*. Recife: Ed. Universitária, 1985. 379p.
- CARDO, L.J.; SALATA, J.; MENDEZ, J.; REDDY, H.; GOODRICH, R. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfus. Apheresis Sci.*, v.37, p. 131–137, 2007.
- CARTANA, C.B. *Transfusão de sangue obtido de doadores anestesiados com cetamina e xilazina ou isoflurano em gatos hipovolêmicos*. 2010. 71f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- COSTA JÚNIOR, J.D. *Avaliação do sangue total de cães armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M*. 2006. 48f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- FIGUEROA, J.V.; CHIEVES, L.P.; JOHNSON, G.S.; BUENING, G.M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet. Parasitol.*, v.50, p.69-81, 1993.
- FISCHER, T.H.; ROBBINS, M.E.; BODE, A.P.; NICHOLS, T.C.; BELLINGER, D.E.; SCHOENFISCH, M.H. Evidence that rehydrated, lyophilized red blood cells are sufficiently deformable for normal microcirculation transit. *Microsc. Res. Tech.*, v.65, n.1-2, p.62-71, 2004.
- GEISE, W.; CONRAD, F.; HEINRICH, H.A. Protection of stored erythrocytes against oxidative stress and insufficient physiological function by enantiomers of α -lipoic acid. *Infusion Ther. Transfus. Med.*, v.26, p.26-32, 1999.
- GODINE, C.; CAPRANI, A. Effect of blood storage on erythrocyte/wall interactions: implications for surface charge and rigidity. *Eur. Biophys. J.*, v.26, p.175-182, 1997.
- GONÇALVES, P.M. Epidemiologia e controle da Tristeza Parasitária Bovina na região sudeste do Brasil. *Ciênc. Rural*, v.30, n.1, p.187-194, 2000.
- GOODRICH, R.; HANSEN, E.; GILMOUR, D.; JESSER, R.; KEIL, S.; GOODRICH, T. Inactivation of pathogens in blood products with riboflavin and

- light. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION, 26., Vienna. *AUTRICHE*, v.78, suppl.2, p.211-215, 2000.
- GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Vet.*, v.21, n.125, p.8-10, 2002.
- HORAK, I.G.; CAMICAS, J.-L.; KEIRANS, J.E. The Argasidae, Ixodidae and Nattullidae (Acari:Ixodida): a word list of valid tick names. *Exp. Appl. Acarol.*, v.28, n.1-4, p.27-54, 2002.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR CONTINUING EDUCATION E TRAINING - IACET. **Tick control**. Disponível em: <<http://www.tlch2o.com/courses/TickControl.pdf>.Arquivo>. Acesso em: 03 ago. 2006.
- JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. Media: Lea e Febinger, 1993. p.133-158.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6.ed. London: Academic Press, 2008. 904p.
- KESSLER, R.H.; MADRUGA, C.R.; SCHENK, M.A.M.; RIBEIRO, O.C. Babesiose cerebral por *Babesia bovis*, (Babes 1888 e STARCOVICI, 1893) em bezerros no estado do Mato Grosso do Sul. *Pesqui. Agropec. Brás.*, v.18, p.931-935, 1983.
- KESSLER, R.H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale* *Pesqui. Vet. Bras.*, v.21, n.4, p.177-179, 2001.
- KESSLER, R.H.; SOARES, C.O.; MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R. Tristeza parasitária dos bovinos: quando vacinar é preciso. EMBRAPA, 2002. Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc_pdf/Doc131.pdf>. Acesso em: 28/01/2011.
- KRAUSE, P.J.; TELFORD III, S.; SPIELMAN, A.; RYAN, R.; MAGERA, J.; RAJAN, T.V.; CHRISTIANSON, D.; ALBERGHINI, T.V.; BOW, L.; PERSING, D. Comparison of PCR with Blood Smear and Inoculation of Small Animals for Diagnosis of *Babesia microti* Parasitemia. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, p.2791-2794, 1996.
- LACERDA, L.A. Transfusão sanguínea em veterinária: desafios a vencer. In: González, FH.D., Santos, A.P. (Eds.). SIMPÓSIO DE PATOLOGIA

- VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2., 2005, Porto Alegre. Anais do 2º Simpósio de Patologia Veterinária: 2005. p.62-81.
- LANEVSKI, A.; WARDROP, K.J. Principles of transfusion medicine in small animals. *Can. Vet. J.*, v.42, p.447-454, 2001.
- MADRUGA C.R.; KESSLER, R.H.; JESUS, E.F.; SETTE, A.J. *Reação de imunofluorescência Indireta para diagnóstico sorológico de Babesia bigemina e Babesia bovis*. Produção de antígenos com cepas isoladas no Estado de Mato Grosso do Sul e avaliação preliminar do teste., *Embrapa-CNPQC*, Campo Grande: Embrapa-CNPQC, 1986. p.1-6. (Pesquisa em Andamento, 32).
- MADRUGA, C.R.; KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M.; MIGUITA, M. A agglutination test for rapid detection of antibodies against *Babesia bigemina*. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.20, n.4, p.161-166, 2000.
- MADRUGA, C.R.; AFONSO, J.A.B. Avaliação clínica e hematológica em Bezerros Nelore infectados experimentalmente com isolados de *Babesia bigemina* das regiões Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 23, n.2, p.52-60, 2003.
- MARTINS, J.R.; CORRÊA, B.L.; CERESÉ, V.H. Estudo comparativo entre as provas de ELISA e Imunofluorescência Indireta (IFI) para detectar anticorpos contra *Babesia bovis*. *Ciênc. Rural*, v.26, n.1, p.115-118, 1996.
- MARTINS, S.R.; COMBS, J.C.; NOGUERA, G.; CAMACHO, W.; WITTMANN, P.; WALTHER, R.; CANO, M.; DICK, J.; BEHRENS, A. Antimicrobial efficacy of Riboflavin/uvA combination (365 nm) in vitro for bacterial and fungal isolates: a potential new treatment for infectious keratitis. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, v.49, p.3402-3408, 2008.
- MENDONÇA, C.L.; VIEIRA, D.; KOHAYAGAWA, A.; SCHENK, M.A.M.; MADRUGA, C.R.; AFONSO, J.A.B. Avaliação clínica e hematológica em Bezerros Nelore infectados experimentalmente com isolados de *Babesia bigemina* das regiões Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.23, n.2, p.52-60, 2003.
- MICHAEL, J.M.; DORNER, I.; BURNS, D.; LADENSON, J.H.; SHERMAN, L.A. Potassium load in CPD-preserved whole blood and two types of packed red blood cells. *Transfusion*, v.15, n.2, p.144-149, 1975.

- PEREIRA, D.A.A. *Avaliação e otimização de Reações da Cadeia em Polimerase para diagnóstico molecular e estudo epidemiológico de Babesia bovis*. 2006. 48f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.
- QUINTÃO-SILVA, M.G.; RIBEIRO, M.F.B. Infection rate of *Babesia* spp. Sporokinetes in Engorged *Boophilus microplus* from an Area of Enzootic Stability in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.98, n.8, p.999-1002, 2003.
- RAZOUK, F.H.; REICHE, E.M.V. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v.26, n.2, p.126-134, 2004.
- REICHMANN, P.; DEARO, A.C.O. Transfusão de sangue e seus derivados em grandes animais. *Semina Ciências Agrárias*, v.22, n.2, p.223-228, 2001.
- REINE, N.J. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, v.19, n.2, p.68-74, 2004.
- RESENDE, V. e PETROIANU, A. Funções do remanescente esplênico após esplenectomia subtotal para o tratamento de lesões complexas do baço humano. *Rev. Assoc. Méd. Brás.*, v.48, n.1, p.26-31, 2002.
- RIBEIRO FILHO, J. D.; ALMEIDA, C. T.; GONÇALVES, R. C.; KOHAYAGAWA, A.; CURY, P. R. Alterações hemogasométrias de sangue bovino durante a conservação em frascos de vidro com ACD e bolsas plásticas com CPDA-1, por 35 dias. *Vet. Zootec.*, v.6, p.77-84, 1994.
- RICKARD, M.D. *Babesia rodhaini*: carbohydrate metabolism and infectivity for rats of cells freed from host erythrocytes. *Exp. Parasitol.*, v.27, p.136-142, 1970.
- RODRIGUES, A.; RECH, R.R.; BARROS, R.R.; FIGHERA, R.A.; BARROS, C.S.L. Epidemiological aspects of a outbreak of cerebral babesiosis in cattle tick free area. *Ciênci. Rural*, v.38, n.9, p.2646-2649, 2008.
- SACCO, A.M.S.; KESSLER, R.H.; MADRUGA, C.R. Cepas atenuadas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e de *Anaplasma centrale* como imunógenos no controle da Tristeza Parasitária Bovina. *Ciênci. Rural*, v.31, n.5, p.849-855, 2001.

- SALIB, A.A.; DAWSON, R.B. Preservation of different types of buffalo leucocytes in ACD and CPD with metabolic additives. *Acta Vet. (Beograd)*, v.35, p.203-216, 1985.
- SCHILD, A.L.; RUAS, J.L.; FARIAS, N.A.; GRECCO, F.B.; SOARES, M.P. Aspectos epidemiológicos de um surto de babesiose cerebral em bovinos em zona livre de carrapato. *Ciênci. Rural*, v.38, n.9, p.2646-2649, 2008.
- SOARES, C.O.; SOUZA, J.C.P.; MADRUGA, C.R.; MADUREIRA, R.C.; MASSARD, C.L.; FONSECA, A.H. Soro prevalência de *Babesia bovis* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.20, n.2, p.75-79, 2000.
- SOLHEIM, B.G.; SEGATCHIAN, J. Update on pathogen reduction technology for therapeutic plasma: an overview. *Transfus. Apheresis Sci.*, v.35, p.83-90, 2006.
- SOUZA, R.S.; BARRÊTO JR., R.A.; SOUSA, I.K.F.; CHAVES, D.F.; SOARES, H.F.; BARROS, I.O.; MINERVINO, A.H.H.; ORTOLANI, E.L. Avaliação de sangue total ovino armazenado em bolsas de sangue (CPDA-1) mantido sob refrigeração. *Ciênci. Anim. Brás.*, v.10, p.290-295, 2009.
- MORGAN, G.; LEECH, N.; GLOECKNER, G.; BARRETT, K. *SPSS for introductory statistics: use and interpretation*. 2.ed. Mahwah, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, 2004.
- TAVARES-MARQUES, L.; REYNA-BELLO, A. Estandarización de la técnica de pcr para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina y ovina. *Agronomía Trop.*, v.56, n.4, p.501-512, 2006.
- TERPSTRA, F.G.; VAN'T WOUT, A.B.; SCHUITMAKER, H. Potentials and limitation of uvC irradiation for the inactivation of pathogens in platelet concentrates. *Transfusion*, v.48, p.304-313, 2008.
- TIZARD, I.R. *Imunologia veterinária: uma introdução*. 8.ed. São Paulo: Rocca, 2009. 520p.
- TOMCZAK, A.C.T.Q.; GRILO, K.T.M.; CASTRO, J.M.; MACHADO, A.M.B.; LEONART, M.S.S.; NASCIMENTO, A.J. Estudo de métodos laboratoriais para o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar), Brasil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v.32, n.3, p.209-214, 2010.

- VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M. Diagnóstico em anaplasmosse bovina. *Ciênc. Rural*, v.31, n.2, p.361-368, 2001.
- VIDOTTO, O. Estratégias de combate aos principais parasitas que afetam os bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2002, Maringá. *Anais...* Maringá: UEM/CCA/DZO, NUPEL, 2001. p.192-212.
- WARDROP, J.; OWEN, T.J.; MEYERS, K.M. Evaluation of an additive solution for preservation of canine red blood cells. *J. Vet. Intern. Med.*, v.8, n.4, p.253-257, 1994.
- WARDROP, K.J.; REINE, N.; BIRKENHEUER, A.; HALE, A.; HOHENHAUS, A.; CRAWFORD, C.; LAPPIN, M.R. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *J. Vet. Intern. Med.*, v.19, n.1, p.135-142, 2005.
- WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. *Schalm's veterinary hematology*. 6.ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. 1206p.

Alterações hematológicas e bioquímicas em sangue bovino obtido de animais saudáveis e parasitados com *Babesia bigemina* conservado em bolsas plásticas conservado em cpda-1 durante 21 dias.

Rafael de O. Reis¹, Leizinara G. Lopes², Silvia R. Vinholi³,
Miriam H. Tsunemi⁴, Pedro P. Pires⁵ e Raimundo S. Lopes⁶.

ABSTRACT.- Reis, R.O., Lopes, L.G., Vinholi, S.R., Tsunemi, M.H., Pires, P.P. e Lopes, R.S. [**Haematological and biochemical alterations in bovine blood obtained of healthy and parasited with *Babesia bigemina* animals when conserved in plastic bags with CPDA-1 during 21 days.**] Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP-Botucatu. rafaelreis_vet@yahoo.com.br. Alterações hematológicas e bioquímicas em sangue bovino obtido de animais saudáveis e parasitados com *Babesia bigemina* conservado em bolsas plásticas conservado em cpda-1 durante 21 dias. The aim of this study was to verify the possible hematological and biochemical alterations that occur in bovine blood obtained from healthy animals and from infected animals with *Babesia bigemina* when kept in plastic bags with CPDA-1. Group 1 was formed by eight plastic bags with blood obtained from healthy bovines and group 2 was formed by eight plastic bags with blood obtained from bovines infected with *Babesia bigemina*. In both groups the Red Blood Cells Count, Hemoglobin Concentration, Packed Cell Volume, Total Plasma Protein, Fibrinogen, White Blood Cell Count, Sodium, Potassium and Lactate was determined every three days, during 21 days. In both groups the preserved blood presented reduction in the Red Blood Cells Count, White Blood Cell Count, Hemoglobin Concentration, Packed Cell Volume, Total Plasma Protein, Fibrinogen and

Sodium and an increase of the Potassium and Lactate concentration occurred in the period of 21 days. The results were considered statistically significant ($p<0,01$). It was observed that the blood preserved in plastic bags suffers hematological and biochemical alterations after 21 days of conservation.

Index Terms: *Babesia bigemina*; bovine; transfusion.

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo verificar as possíveis alterações hematológicas e bioquímicas que ocorrem no sangue bovino obtido de animais hígidos e parasitados com *Babesia bigemina*, quando conservado em bolsas plásticas contendo CPDA-1. O grupo 1 foi formado por oito bolsas plásticas contendo sangue proveniente de bovinos saudáveis e o grupo 2 foi formado por oito bolsas plásticas contendo sangue proveniente de bovinos parasitados com *Babesia bigemina*. Em ambos os grupos foi determinado a Contagem Total de Hemácias, Concentração da Hemoglobina, Volume Globular, Proteína Plasmática Total, Fibrinogênio, Contagem Total de Leucócitos, Sódio, Potássio e Lactato a cada três dias durante 21 dias. Em ambos os grupos o sangue conservado apresentou redução do número total de hemácias e leucócitos, da Concentração da Hemoglobina, Volume Globular, Proteína Plasmática Total, Fibrinogênio e Sódio e ocorreu um aumento na concentração de Potássio e Lactato no decorrer de 21 dias. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos ($p<0,01$). Desta forma foi observado que o sangue conservado em bolsas plásticas sofre alterações hematológicas e bioquímicas após 21 dias de conservação. Apesar das alterações observadas, o sangue manteve-se viável para transfusão.

Termos de indexação: *Babesia bigemina*; Bezerros; Transfusão.

INTRODUÇÃO

Recentemente, a hemoterapia está se tornando cada vez mais acessível na medicina veterinária e, assim como em humanos, muitos cuidados devem ser tomados para minimizar os riscos de transmissão de doenças provenientes de animais doadores (Reine 2004, Wardrop et al. 2005). Existem escassos relatos sobre a transfusão sanguínea em bovinos no Brasil, além disso, a alta incidência de hemoparasitoses no rebanho bovino do país, que somada a grande dificuldade de combate do vetor, leva a uma alta incidência de Babesiose e Anaplasmoses e torna o estudo da estabilidade *in vitro* de bolsas contendo sangue parasitado de significativa importância para o reconhecimento e acompanhamento das alterações que ocorrem neste tecido no decorrer do tempo de armazenamento. Os objetivos do experimento foram verificar as alterações hematológicas e bioquímicas que ocorreram no sangue bovino obtido de animais saudáveis e parasitados com *Babesia bigemina* quando conservado em bolsas plásticas contendo conservante CPDA-1 durante 21 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados bezerros, machos e fêmeas mestiços das raças Nelore e Caracu com idade, entre oito e 12 meses. O peso dos animais variou de 188 a 260 kg. Os bovinos pertenciam à Embrapa Gado de Corte. Antes do início do experimento os animais foram desverminados com aplicações subcutâneas de ivermectina e vacinados contra Brucelose, Leptospirose, Rinotraqueíte Infecciosa Bovina e Diarréia Viral Bovina. Os animais eram clinicamente sadios e recebiam concentrado pela manhã. O volumoso (feno) era fornecido duas vezes ao dia e, assim como a água, estavam disponíveis *ad libitum*. Trinta dias

antes das primeiras cirurgias, os animais selecionados foram colocados em baias individuais no setor de isolamento da Embrapa – Gado de Corte. Foram submetidos a rigoroso controle de ectoparasitas. Isto era feito por meio de banho carrapaticida com solução de Amitraz a cada 15 dias. Após serem inseridos nas baias do isolamento, os animais foram tratados com ectoparasiticida à base de Fipronil. Durante o período de adaptação os animais eram manipulados duas vezes ao dia, com o intuito de acostumarem com o manejo do experimento. Os bezerros foram submetidos à cirurgia de esplenectomia total conforme técnica descrita por Alves et al. (1984), para que, na ausência do baço, se tornassem mais suscetíveis à infecção por *Babesia bigemina* conforme citado por Vidotto & Marana (2001), Resende & Petroianu (2002). Três semanas após a esplenectomia, um animal foi inoculado com uma alíquota de 2 mL de sangue contendo 3×10^6 hemácias parasitadas com *Babesia bigemina* com o intuito de promover parasitemia nesse bezerro para que este fosse utilizado como doador das bolsas de sangue. Esse bovino foi monitorado diariamente por meio da avaliação do Volume Globular e esfregaço sanguíneo corado para verificar o grau de parasitemia obtido, conforme técnica descrita por Weiss & Wardrop (2010). O sangue foi colhido para conservação em bolsa plástica, quando foi possível a identificação do parasita na lâmina corada e ao atingir valor de 15% de Volume Globular. Foram colhidos 450 mL de sangue em cada bolsa plástica contendo conservantes do tipo Citrato-Fosfato-Dextrose-Adenina-1 (CPDA-1) e mantidas refrigeradas em geladeira, a uma temperatura de 1 a 4° C durante 21 dias. Durante a colheita o sangue foi movimentado constantemente de modo que o mesmo fosse apropriadamente homogeneizado aos seus conservantes. Para facilitar a colheita, a bolsa

plástica ficou em um nível mais baixo de modo que a força da gravidade ajudasse no processo de preenchimento da bolsa. O grupo I foi composto por oito bolsas plásticas contendo sangue obtido de bezerro hígido e o grupo II foi formado por oito bolsas plásticas contendo sangue bovino parasitado por *Babesia bigemina* proveniente de um bovino positivo para esta hemoparasitose. Em ambos os grupos houve a retirada de amostras sanguíneas das bolsas a cada três dias para a realização dos exames hematológicos e bioquímicos. Foram realizadas as seguintes análises: Volume Globular, Contagem total de hemácias e leucócitos, Concentração da Hemoglobina, Proteína Plasmática Total, Fibrinogênio Plasmático e Concentração Plasmática de Sódio, Potássio e Lactato. A comparação das medidas entre os grupos foi realizada por meio do teste t para amostras independentes e a comparação dos valores entre o momento inicial e final do estudo foi realizada por meio do teste t para amostras pareadas. Os valores de $p < 0,01$ foram considerados estatisticamente significativos das medidas médias entre os grupos comparados. Os perfis de médias auxiliam na interpretação dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variação dos valores médios da contagem de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) e desvio padrão de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses, provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 do Grupo I (Hígido) está descrita no Quadro 1. Houve uma redução significativa ($p < 0,01$) dos valores médios do número total de hemácias no decorrer do tempo nos dois grupos. No grupo I, no primeiro dia de análise foi encontrado um valor médio de $6,19 \times 10^6 \pm 359,7$ (hemácias por

mm³). Estes valores reduziram para $4,58 \times 10^6 \pm 296,8$ (hemácias/ mm³) após 21 dias de conservação. Não houve diferença estatística entre os comportamentos dos grupos I e II. Os animais do grupo II apresentaram anemia já no primeiro dia de análise. Esta é uma das alterações mais comumente encontradas em animais com babesiose (Mendonça et al. 2003, Bazan et al. 2008). A variação dos valores médios do grupo II (parasitado com *Babesia bigemina*) foi de $2,11 \times 10^6 \pm 266,4$ (hemácias/ mm³) no primeiro dia reduzindo para $0,94 \times 10^6 \pm 530,6$ (hemácias/ mm³) no dia 21. Os valores médios verificados no grupo parasitado foram significativamente menores que do grupo hígido ($p < 0,01$) (Quadro 1). A redução da contagem de hemácias no decorrer do período de conservação ocorreu provavelmente devido à hemólise, alteração que pode ter sido provocada pelas lesões de estocagem. O plasma contido nas bolsas apresentava coloração avermelhada confirmando esta alteração. Estes resultados encontram-se de acordo com os valores encontrados por Ribeiro Filho (1994), Almosny et al.(2000), Fischer et al. (2004), Bazan et al. (2008). Foi verificada uma redução dos valores médios da Concentração de Hemoglobina do grupo I. Os valores médios encontrados no primeiro dia foram $10,1 \pm 1,8$ (g/dL) que reduziram para $8,7 \pm 0,6$ (g/dL) no dia 21 (Quadro 2). Não foram observadas alterações estatísticas significativas no grupo parasitado, em que foi encontrada uma média de $3,1 \pm 0,3$ (g/dL) no primeiro dia e uma média de $3,2 \pm 0,4$ (g/dL) no último dia de análise (Quadro 2). A redução da Concentração da Hemoglobina no decorrer do tempo ocorreu provavelmente devido às lesões de estoque, principalmente a hemólise que ocorre em sangue conservado em bolsas para transfusão contendo CPDA-1.

Estes resultados estão de acordo com os valores encontrados por Ribeiro Filho (1994), Almosny et al. (2000), Fischer (2004).

Não houve variação na média da Concentração da Hemoglobina do grupo II, provavelmente porque o animal doador do sangue para a conservação já apresentava baixos valores da concentração da hemoglobina no primeiro dia de análise. Foi verificada uma redução dos valores de Volume Globular no grupo I ($p < 0,01$). No primeiro dia de análise das bolsas do grupo 1 (hígido) foi encontrada uma média de 30 ± 3 (%) que foi reduzida para $24 \pm 0,5$ (%) após 21 dias (Quadro 1). Já no grupo parasitado, as médias variaram de $12 \pm 2,2$ (%) para $10 \pm 0,5$ (%) (Quadro 1). Novamente foi observada uma diferença estatística entre os grupos I e II ($p < 0,01$). A redução do Volume Globular no decorrer do tempo ocorreu provavelmente devido à hemólise que acontece em sangue conservado em bolsas para transfusão contendo CPDA-1, decorrente de lesões de estocagem. Estes resultados estão de acordo com os valores encontrados por Ribeiro Filho (1994); Almosny et al. (2000), Fischer (2004). Assim como foi observado na Concentração da Hemoglobina, os valores médios do Volume globular das bolsas do grupo II não tiveram diferenças significativas em relação ao período inicial e final de análise. Isso ocorreu provavelmente porque o animal doador do sangue para a conservação já apresentava baixos valores da concentração da hemoglobina no primeiro dia de análise. A concentração da Proteína Plasmática Total do grupo I reduziu no período de estocagem. No dia 0, os valores médios encontrados foram de $6,5 \pm 0,4$ (g/dL), que decaíram para $5,7 \pm 0,2$ (g/dL) no último dia de análise ($p < 0,01$) (Quadro 2). Não foi observada diferença significativa nas análises realizadas no grupo II, em que foram encontradas médias de $3,7 \pm 0,2$ (g/dL) no

dia 0 e $3,7 \pm 0,4$ no dia 21. Foram encontrados valores de Proteína Plasmática Total no grupo II significativamente menores que no grupo controle ($p < 0,01$) (Quadro 2). A queda dos valores da Proteína Plasmática Total no início do período de conservação foi decorrente da hemoparasitose presente no animal doador do sangue para as bolsas do grupo II. Estes resultados são semelhantes aos verificados por Ribeiro Filho (1994). Durante o período de armazenamento ocorre uma desnaturação de proteínas plasmática devido à redução do pH que acontece no decorrer do tempo (Cairutas, 1985). O aumento da acidez do plasma promove desnaturação protéica no interior da bolsa (Ribeiro Filho 1994, Costa Júnior 2006). As determinações de Fibrinogênio Plasmático do grupo I tiveram média de $450 \pm 141,4$ (mg/dL) que, ao final do experimento, mostrou uma redução para $300 \pm 106,9$ (mg/dL), não apresentando uma diferença estatística significativa entre os períodos analisados, $p = 0,014$ (Quadro 3). Já no grupo II, houve uma redução significativa destes valores ($p < 0,01$). No primeiro dia foi encontrada uma média de $500 \pm 106,9$ (mg/dL), enquanto no dia 21 foi encontrada uma média de $250 \pm 92,6$ (mg/dL) (Quadro 3). Houve diferença significativa entre os grupos I e II. Como ocorreu uma tendência de queda dos valores de fibrinogênio plasmático do grupo I, talvez essa redução se tornasse mais evidente se fosse analisado um período maior de conservação. Provavelmente, houve desnaturação do fibrinogênio devido ao acúmulo de íons H^+ que ocorre no interior da bolsa no decorrer do tempo. Devido à retirada do sangue da circulação, o metabolismo das células gera uma redução do pH, principalmente por causa da metabolização da glicose em lactato, levando a um acúmulo de íons H^+ , conforme citado por Ribeiro Filho (1994) e Costa Júnior (2006). Houve

uma redução dos valores da contagem de leucócitos em ambos os grupos analisados. O grupo I apresentou uma média de $15198,8 \pm 1778,14$ (leucócitos/mm³) no primeiro dia de análise. Esses valores reduziram para $8942,5 \pm 2557,55$ no dia 21 ($p < 0,01$) (Quadro 4). Já no grupo II houve uma redução de $19962,5 \pm 1778,1$ (leucócitos/mm³) para $10883,8 \pm 986,1$ no último dia ($p < 0,01$) (Quadro 4). Não houve diferença significativa entre os dois grupos analisados. Esses dados corroboram com a pesquisa realizada por Ribeiro Filho (1994): sangue bovino conservado em bolsas apresenta uma redução do número de leucócitos no decorrer do tempo. Isso acontece principalmente devido à degranulação de polimorfonucleares. Esses resultados são semelhantes aos verificados por Salib & Dawson (1985), em sangue de búfalos, que também descrevem a degranulação de polimorfonucleares como a principal causa da redução da contagem total de leucócitos em sangue conservado para transfusão. A presença de crioglobulinas, criofibrinogênio, plaquetas acumuladas e fibrinas da coagulação podem ser contadas como leucócitos em contadores automáticos. Por isso, os valores encontrados foram maiores do que os valores de referência (Jain 1993, Weiss & Wardrop, 2010). Os valores médios de sódio plasmático reduziram no decorrer do período de observação. No grupo I, as concentrações deste íon no primeiro dia de análise apresentavam média de $200,9 \pm 23,9$ (mg/dL). Estes valores reduziram para $172,4 \pm 23,1$ (mg/dL) após 21 dias de análise (Quadro 5). Situação semelhante ocorreu nas concentrações plasmáticas de sódio do grupo II. Ocorreu uma redução de $171,5 \pm 12,4$ (mg/dL) para $138,1 \pm 13,1$ (mg/dL) (Quadro 5). Não houve diferença estatística entre os grupos ($p = 0,003$). A redução do sódio se deve à diminuição dos níveis de ATP disponíveis no plasma da bolsa. Com

isso, ocorre uma diminuição da atividade da enzima Sódio/Potássio ATPase. Ocasionalmente um acúmulo de sódio no meio intracelular, reduzindo sua concentração livre no plasma. Estes dados estão de acordo com os resultados verificados por Ribeiro Filho (1994). Ambos os grupos apresentaram elevação significativa das concentrações plasmáticas de potássio ($p < 0,01$). No grupo I, foi determinada uma concentração média de potássio de $4,0 \pm 0,3$ (mg/dL) no dia zero, que aumentou no decorrer do tempo, atingindo valores de $6,0 \pm 0,9$ no dia 21 (Quadro 5). Situação semelhante ocorreu no grupo 2, em que os valores médios variaram de $3,0 \pm 0,4$ a $4,2 \pm 0,3$ (mg/dL) (Quadro 5). O aumento do potássio no plasma ocorreu possivelmente devido à presença deste íon na solução preservadora, ao tempo de conservação, à atividade da enzima de Na/K ATPase e à hemólise. O rompimento da hemácia promove a liberação dos íons presente no interior dessa célula. Os resultados observados neste experimento estão de acordo com os de Ribeiro Filho (1994) e Michael (1975), em que foi verificado o aumento das concentrações de potássio plasmático durante o período de conservação. Foi verificado um aumento estatístico significativo dos níveis plasmáticos de lactato nas bolsas de sangue do grupo I ($p < 0,01$). No primeiro dia de análise foi observado um valor médio de $4,0 \pm 0,3$ (mg/dL). Essa média elevou para $15,4 \pm 4,1$ (mg/dL) após 21 dias de conservação (Quadro 5). Por outro lado, as médias do grupo parasitado não se alteraram após 21 dias de análise: $19,9 \pm 1,3$ (mg/dL) e $19,9 \pm 1,0$ (mg/dL), respectivamente (Quadro 5). Esses dados mostram uma diferença no comportamento dos grupos I e II. Foi verificado que as bolsas de sangue do grupo II já apresentavam níveis de lactato elevados desde o primeiro dia de análise. Possivelmente, a hemoparasitose contribuiu para a elevação das

concentrações plasmáticas de lactato. As bolsas de sangue de bovinos hígidos (grupo I) apresentaram aumento dos níveis de lactato plasmático com o decorrer do período de conservação. Estes resultados estão de acordo com encontrados por Costa Júnior (2006). Esse aumento ocorreu devido ao metabolismo da glicose presente na bolsa de sangue contendo CPDA-1. O acúmulo do lactato é o principal responsável pela redução do pH no interior da bolsa. As bolsas de sangue proveniente de bovinos parasitados com *B. bigemina* já apresentavam elevados níveis de lactato no primeiro momento de análise. Talvez esta seja uma alteração pertinente da babesiose.

CONCLUSÕES

A estocagem de sangue bovino conservado em CPDA-1 por 21 dias em temperatura de 4 a 8°C promoveu a redução da contagem de hemácias e Leucócitos, diminuição do Volume Globular, Concentração da Hemoglobina, Proteína Plasmática Total, Fibrinogênio e Sódio. Além disso, promove aumento de Potássio e Lactato. Estas alterações foram verificadas tanto no sangue obtido de bezerros hígidos quanto parasitados com *Babesia bigemina*. Apesar das alterações observadas, o sangue mantém suas características de viabilidade.

Comitê de Ética

Antes da realização desta pesquisa, o projeto deste experimento foi submetido ao comitê de ética para uso de animais da FMVZ-UNESP sob o número do protocolo 75/2009 – CEUA e aprovado em 30/06/2009.

Agradecimentos:

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo aporte financeiro para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almosny, N.R.P.; Soares, F.M.D.; Cardoso, A.; Vasconcelos, T.C.; Monteiro, A.O. Avaliação da deficiência eritrocitária da glicose-6-fosfato desidrogenase e valores hematológicos de equinos de salto. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, v.7, n.1, p.14-16, 2000.

Alves, G.E.S.; Silva, R.B. Da; Santos Filho, H.A.; Lazzeri, L.; Santos, E.S.; Beteille, P.R.B. Esplenectomia em bovino. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Brazil)*. v. 7, n.2, p. 135-138, 1984.

Bazan, C.T.; Camargo, G.O.A.; Santos, M.A. Babesiose bovina. *Rev. Eletrôn. Méd. Vet.*, n.11, 2008.

Cairutas, G.M. *Componentes e derivados do sangue para uso terapêutico*. Recife: Ed. Universitária, 1985. 379p.

Costa Júnior, J.D. *Avaliação do sangue total de cães armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CPD/SAG-M*. 2006. 48f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

Fischer, T.H.; Robbins, M.E.; Bode, A.P.; Nichols, T.C.; Bellinger, D.E.; Schoenfisch, M.H. Evidence that rehydrated, lyophilized red blood cells are sufficiently deformable for normal microcirculation transit. *Microsc. Res. Tech.*, v.65, n.1-2, p.62-71, 2004.

Mendonça, C.L.; Vieira, D.; Kohayagawa, A.; Schenk, M.A.M.; Madruga, C.R.; Afonso, J.A.B. Avaliação clínica e hematológica em Bezerros Nelore infectados

experimentalmente com isolados de *Babesia bigemina* das regiões Sudeste, Nordeste e Norte do Brasil. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.23, n.2, p.52-60, 2003.

Michael, J.M.; Dorner, I.; Burns, D.; Ladenson, J.H.; Sherman, L.A. Potassium load in CPD-preserved whole blood and two types of packed red blood cells. *Transfusion*, v.15, n.2, p.144-149, 1975.

Reine, N.J. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, v.19, n.2, p.68-74, 2004.

Resende, V.; Petroianu, A. Funções do remanescente esplênico após esplenectomia subtotal para o tratamento de lesões complexas do baço humano. *Rev. Assoc. Méd. Brás.*, v.48, n.1, p.26-31, 2002.

Ribeiro Filho, J. D.; Almeida, C. T.; Gonçalves, R. C.; Kohayagawa, A.; Cury, P. R. Alterações hemogasométrias de sangue bovino durante a conservação em frascos de vidro com ACD e bolsas plásticas com CPDA-1, por 35 dias. *Vet. Zootec.*, v.6, p.77-84, 1994.

Salib, A.A.; Dawson, R.B. Preservation of different types of buffalo leucocytes in ACD and CPD with metabolic additives. *Acta Vet. (Beograd)*, v.35, p.203-216, 1985.

Vidotto, O. E Marana, E.R.M. Diagnóstico em anaplasmoose bovina. *Ciênc. Rural*, v.31, n.2, p.361-368, 2001.

Wardrop, K.J.; Reine, N.; Birkenheuer, A.; Hale, A.; Hohenhaus, A.; Crawford, C.; Lappin, M.R. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *J. Vet. Intern. Med.*, v.19, n.1, p.135-142, 2005.

Weiss, D.J.; Wardrop, K.J. *Schalm's veterinary hematology*. 6.ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. 1206p.

Quadro 1. Variação dos valores médios e desvio padrão da Contagem total de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), Concentração da Hemoglobina e Volume Globular de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo 1 (Hígido, n=8) e Grupo 2 (*Babesia bigemina*, n=8).

DIA	He GI	He GII	Hb GI	Hb GII	VG GI	VG GII
DIA 0	6,19 ^a ±359,66	2,12 ^e ±266,40	10,11 ^e ±1,83	3,13 ^g ±0,32	30 ^{hi} ±3,40	12 ^l ±2,20
DIA 3	6,14 ±410,50	2,01 ±394,20	9,80 ±0,65	3,14 ±0,43	28 ±1,96	11 ±1,25
DIA 6	5,93 ±1127,03	2,07 ±277,32	10,06 ±1,13	3,20 ±0,35	25 ±1,99	10 ±1,16
DIA 9	5,02 ±853,78	1,47 ±351,41	10,05 ±0,77	3,23 ±0,20	25 ±1,19	10 ±0,53
DIA 12	5,17 ±718,01	0,79 ±177,68	8,69 ±0,66	3,14 ±0,22	25 ±0,99	10 ±0,74
DIA 15	4,83 ±460,19	1,04 ±483,81	8,60 ±0,48	3,34 ±0,42	24 ±1,07	10 ±0,53
DIA 18	4,77 ±445,13	0,91 ±481,28	8,86 ±0,42	3,39 ±0,42	24 ±0,74	10 ±0,53
DIA 21	4,58 ^b ±296,83	0,94 ^d ±530,63	8,74 ⁱ ±0,57	3,24 ^g ±0,38	24 ⁱ ±0,52	10 ^{jj} ±0,52

≠ ab: p<0,01; ≠ cd: p<0,01;

≠ ef: p<0,01; ~gg: p=0,259

≠ hi: p<0,01; ~jj: p=0,10

Quadro 2. Variação dos valores médios de Proteína Plasmática Total (g/dL) e desvio padrão em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo 1 (Hígido, n=8) e Grupo 2 (*Babesia bigemina*, n=8).

DIA	GRUPO 1	DESVIO PADRÃO	GRUPO 2	DESVIO PADRÃO
DIA 0	6,5 ^a	0,40	3,7 ^c	0,19
DIA 3	6,6	0,17	3,9	0,14
DIA 6	5,4	0,15	3,6	0,29
DIA 9	5,7	0,15	3,7	0,26
DIA 12	5,3	0,18	3,9	0,15
DIA 15	5,6	0,09	3,7	0,21
DIA 18	5,3	0,15	3,8	0,30
DIA 21	5,7 ^b	0,15	3,7 ^c	0,35

≠ ab: p<0,01; ~cc: p=0,867

Quadro 3. Variação dos valores médios de Fibrinogênio (mg/dL) e desvio padrão em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo 1 (Hígido, n=8) e Grupo 2 (*Babesia bigemina*, n=8).

DIA	GRUPO	DESVIO	GRUPO	DESVIO
	1	PADRÃO	2	PADRÃO
DIA 0	450 ^a	141,4	500 ^b	106,9
DIA 3	375	70,7	525	103,5
DIA 6	375	70,7	550	92,6
DIA 9	350	92,6	550	141,4
DIA 12	350	92,6	500	106,9
DIA 15	300	106,9	300	151,2
DIA 18	300	106,9	325	183,2
DIA 21	300 ^a	106,9	250 ^c	92,6

~aa: p=0,014; ≠ bc: p<0,01

Quadro 4. Variação dos valores médios da contagem total de leucócitos (leucócitos/ μ L) de sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo 1 (Hígido, n=8) e Grupo 2 (*Babesia bigemina*, n=8).

DIA	GRUPO 1	DESVIO PADRÃO	GRUPO 2	DESVIO PADRÃO
DIA 0	15198,7 ^a	1778,14	19962,5 ^c	4728,32
DIA 3	14555,0	2633,95	16037,5	3874,80
DIA 6	13195,0	2172,18	14787,5	3146,60
DIA 9	12270,0	1438,97	13976,2	2681,10
DIA 12	11085,0	2192,21	12553,7	2018,00
DIA 15	9837,5	2905,14	11858,7	1163,60
DIA 18	9550,0	2788,38	11375,0	1282,60
DIA 21	8942,5 ^b	2557,56	10883,75 ^d	986,10

≠ ab: p<0,01; ≠ cd: p<0,01

Quadro 5. Variação dos valores médios e desvio padrão de Sódio (mg/dL), Potássio (mg/dL) e Lactato (mg/dL) em sangue de bezerros mestiços, conservado em CPDA-1 dos Grupo 1 (Hígido, n=8) e Grupo 2 (*Babesia bigemina*, n=8).

DIA	Sódio GI	Sódio GII	Potássio GI	Potássio GII	Lactato GI	Lactato GII
DIA 0	200,9 ^a ±23,89	171,5 ^c ±12,42	4,0 ^e ±0,30	3,0 ^g ±0,37	3,95 ^h ±0,89	19,9 ^j ±1,28
DIA 3	193,4±19,75	167,0±13,89	4,3±0,30	3,1±0,41	6,48±0,69	20,7±0,63
DIA 6	188,9±19,36	164,1±12,91	4,5±0,30	3,4±0,37	13,40±3,15	21,8±3,07
DIA 9	186,5±19,62	157,4±9,74	4,8±0,40	3,5±0,37	15,29±4,84	23,2±3,65
DIA 12	184,88±19,69	153,1±9,46	5,3±0,40	3,6±0,44	14,13±2,21	20,7±1,16
DIA 15	181,0±21,95	147,8±12,16	5,6±0,70	3,9±0,41	14,54±3,77	21,8±4,76
DIA 18	176,1±22,27	143,6±12,07	5,8±0,70	4,1±0,41	16,47±1,96	20,5±1,70
DIA 21	172,4 ^b ±23,11	138,1 ^d ±13,11	6,0 ^f ±0,90	4,2 ^g ±0,33	15,41 ⁱ ±4,12	19,9 ^j ±1,00

≠ ab: p<0,01; ≠ cd: p<0,01;

≠ ef: p<0,01; ~gg: p>0,001;

≠ hi: p<0,01; ~jj: p>0,01

Avaliação da ação da Riboflavina associada à luz ultravioleta na inativação, redução ou completa eliminação de *Babesia bigemina* em sangue bovino mantido sob refrigeração.

Rafael de O. Reis¹, Leizinara G. Lopes², Silvia R. Vinholi³,
Miriam H. Tsunemi⁴, Pedro P. Pires⁵ e Raimundo S. Lopes⁶.

ABSTRACT.- Reis, R.O., Lopes, L.G., Vinholi, S.R., Tsunemi, M.H., Pires, P.P. e Lopes, R.S. [Effects of Riboflavin associated to ultraviolet light in the inactivation, reduction or complete elimination of *Babesia bigemina* in bovine blood maintained in refrigeration.] Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP-Botucatu. rafaelreis_vet@yahoo.com.br. The aim of this study was to verify the effect of the use of Riboflavin associated with ultraviolet light (B2/uv) in the inactivation, reduction or complete elimination of the *Babesia bigemina*. Stained blood smear, indirect immunofluorescence reaction (IIR) and quantitative Polymerase Chain Reaction were done to diagnose the presence of *Babesia bigemina* before and after the treatment with Riboflavin and ultraviolet radiation in blood. The calves were divided in three groups: Group I – formed by two splenectomized calves that received parasited blood without B2/uv. Group II – formed by three health calves (non-splenectomized) and Group III – formed by three splenectomized calves. The calves from groups II and III were inoculated with parasited blood after treatment with (B2/uv). Stained blood smear, Indirect Immunofluorescence Reaction (IIR) and quantitative Polymerase Chain Reaction were repeated on the days 7, 14 and 21 after the inoculation. The results of Stained blood smear showed a parasitemia reduction over time. The Indirect Immunofluorescence Reaction showed that the animal presented antibodies against *Babesia bigemina* 14 days after inoculation. The results of qPCR showed that no fragments of *Babesia bigemina* DNA in the samples analysed. The confrontation of many diagnostic techniques for babesiosis proved to have a great sensitivity of Indirect Immunofluorescence Reaction in detection of anti*Babesia bigemina* antibodies. The *Babesia bigemina* was not eliminated by the use of Riboflavin and ultraviolet radiation.

INDEX TERMS: *Babesia bigemina*; bovine; irradiation; transfusion; Vitamin B2.

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo verificar a efeitos do uso da Riboflavina associada à Radiação Ultravioleta (B2/uv) na inativação, redução ou completa eliminação de *Babesia bigemina* em sangue conservado em bolsas para transfusão contendo CPDA-1. Foi realizado Esfregaço Sanguíneo Corado, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) antes e após tratamento com Riboflavina e Radiação Ultravioleta para verificar a presença de *Babesia bigemina* no sangue. Os bezerros foram separados em três grupos: Grupo I - formado por dois animais esplenectomizados que receberam sangue parasitado sem tratamento por Riboflavina e Luz Ultravioleta; Grupo II - formado por três animais hígidos e Grupo III - formado por três animais esplenectomizados. Os bezerros dos grupos II e III foram inoculados com sangue bovino parasitado após tratamento com Riboflavina e Luz Ultravioleta. Esfregaço Sanguíneo Corado, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) foram repetidos sete, 14 e 21 dias pós-inoculação. Os resultados do esfregaço corado em lâminas demonstraram uma redução do grau de parasitemia no decorrer do tempo. A Reação de Imunofluorescência Indireta demonstrou que os animais apresentaram anticorpos contra *Babesia bigemina* a partir de 14 dias após a inoculação. Os resultados da técnica da qPCR demonstram que não foram identificados fragmentos de DNA de *Babesia bigemina* nas amostras analisadas. O confronto das diversas técnicas de diagnóstico para a babesiose realizadas neste estudo comprovou grande sensibilidade da Reação de Imunofluorescência Indireta na detecção de anticorpos anti*Babesia bigemina*. Desta forma foi observado que a *Babesia bigemina* não foi eliminada pelo uso da Riboflavina associada à ultravioleta.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Babesia bigemina*; Bezerros; Irradiação, Transfusão; Vitamina B2.

INTRODUÇÃO

A introdução da terapia transfusional na medicina veterinária foi um processo mais lento do que na medicina humana, porém o interesse pela hemoterapia tem crescido nestes últimos anos e atualmente existem grandes bancos de sangue veterinários em vários países do mundo. Isso tornou possível a prática da medicina transfusional veterinária de alta qualidade. Recentemente, a hemoterapia está se tornando cada vez mais acessível à medicina veterinária e muitos cuidados devem ser tomados para minimizar os riscos de transmissão de doenças provenientes de animais doadores (Reine 2004, Wardrop 2005). Relata-se a Tristeza Parasitária Bovina (TPB) como sendo uma parasitose provocada por protozoários do gênero *Babesia* (*B. bovis* e *B. bigemina*) e uma *rickettsia* denominada *Anaplasma marginale*. Esses parasitas são transmitidos por carrapatos. A transmissão da TPB pode ocorrer também pela transfusão sanguínea, embora existam escassos relatos sobre a transfusão sanguínea em bovinos no Brasil (Kessler et al. 1983, Rodrigues et al. 2008). À alta incidência de hemoparasitoses no rebanho bovino do país soma-se a grande dificuldade de combate ao vetor. Isto promove uma grande ocorrência de Babesiose e Anaplasmoses e torna o estudo da estabilidade *in vitro* de bolsas contendo sangue parasitado de significativa importância para o reconhecimento e acompanhamento das alterações que venham a ocorrer nesse tecido no decorrer do tempo de armazenamento. As diversas técnicas de inativação de patógenos promovem uma maior segurança na terapia transfusional reduzindo as chances de animais contraírem doenças provenientes de sangue contaminado. Uma técnica promissora é a da Riboflavina associada à irradiação ultravioleta, que tem se mostrado eficaz na inativação de diversos patógenos. Dentre eles, podemos citar bactérias, vírus e

protozoários (Solheim & Seghatchian 2006, Cardo et al. 2007, Callahan et al. 2008, Terpstra et al. 2008). Em função da grande importância da transfusão sanguínea em animais enfermos, da Tristeza Parasitária Bovina no Brasil, e da necessidade da utilização de sangue e seus derivados isentos de patógenos, o presente experimento foi realizado para comprovar a eficácia do tratamento com Riboflavina sob ação da Luz Ultravioleta na inativação de *Babesia bigemina* em sangue bovino conservado para transfusão. O objetivo deste experimento foi verificar o efeito do uso da Riboflavina associada à luz ultravioleta na inativação, redução ou completa eliminação de parasitas intracelulares como *Babesia bigemina*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados bovinos mestiços das raças Nelore e Caracu, machos e fêmeas com idade entre oito e 12 meses. O peso dos animais variou de 188 a 260 kg. Os bezerros pertenciam à Embrapa Gado de Corte. Antes do início do experimento os animais foram desverminados com aplicações subcutâneas de ivermectina e vacinados contra Brucelose, Leptospirose, Rinotraqueíte Infeciosa Bovina e Diarréia Viral Bovina. Os animais eram clinicamente sadios e recebiam concentrado pela manhã. O volumoso (feno) era fornecido duas vezes ao dia e, assim como a água, estavam disponíveis *ad libitum*. Trinta dias antes das primeiras cirurgias, os animais selecionados foram colocados em baias individuais no setor de isolamento da Embrapa Gado de Corte. Foram submetidos a rigoroso controle de ectoparasitas. Isto era feito por meio de banho carrapaticida com solução de Amitraz a cada 15 dias. Após serem inseridos nas baias do isolamento, os animais foram tratados com

ectoparasiticida à base de Fipronil. Durante o período de adaptação os animais eram manipulados duas vezes ao dia, com o intuito de acostumarem com o manejo do experimento. Os bezerros foram submetidos à cirurgia de esplenectomia total para que, na ausência do baço, se tornassem mais suscetíveis à infecção por *Babesia bigemina* conforme citado por Vidotto & Marana (2001); Resende & Petroianu (2002). Em um primeiro momento foi feito Esfregaço Sanguíneo Corado, Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) para avaliação da presença de *Babesia bigemina*. Depois, este sangue bovino parasitado foi submetido a tratamento com Riboflavina associado à Radiação Ultravioleta. Após o tratamento, o sangue foi novamente submetido à avaliação por Reação de Imunofluorescência Indireta, Esfregaço Sanguíneo Corado e qPCR para verificar se os hemoparasitas contidos nesse sangue foram inativados, reduzidos ou destruídos por completo. Posteriormente, esse sangue foi inoculado em animais esplenectomizados para verificar se permanecia ou não com capacidade de transmitir a hemoparasitose. Os bezerros foram divididos em: Grupo I - formado por dois animais esplenectomizados que receberam sangue parasitado sem tratamento por Riboflavina e luz ultravioleta; Grupo II - formado por três animais hígidos e Grupo III - formado por três animais esplenectomizados. Os bezerros dos grupos II e III foram inoculados com sangue bovino parasitado após tratamento com Riboflavina e luz ultravioleta. Para a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), o sangue para obtenção do soro foi colhido por venopunção da veia jugular externa em tubos a vácuo siliconizados (Vacutainer ®), com a finalidade de detectar a soroconversão e para determinar a titulação de anticorpos. A prova de RIFI foi realizada

conforme metodologia descrita por Madruga et al. (1986). Os animais foram avaliados diariamente por meio de esfregaço Sanguíneo, Volume Globular, avaliação da coloração das mucosas, comportamento e temperatura corpórea. A amostra foi colhida por punção de sangue periférico de ponta de orelha para a realização de Esfregaço Sanguíneo Corado e Volume Globular, conforme Weiss & Wardrop (2010). Sete dias após a inoculação de sangue, foram feitas colheitas de amostras sanguíneas de todos os animais para diagnóstico de hemoparasitose por meio de Esfregaço Sanguíneo Corado, da técnica da Reação de Imunofluorescência Indireta conforme Madruga (1986) e do qPCR conforme Buling (2007). Esse processo foi repetido novamente nos dias 14 e 21 pós-inoculação. A técnica Redução de patógenos por meio do uso Riboflavina e Radiação Ultravioleta utilizada neste experimento corresponde a uma adaptação do procedimento realizado por Bryant, et al. (2007) e Cardo et al. (2007). O sangue armazenado em bolsas para transfusão contendo CPDA-1 foi adicionado a 500µM de Riboflavina diluída em solução fisiológica de modo a atingir a concentração final de 50 µM com pH entre 4 e 5. O sangue colocado em frasco de poliestireno foi inserido em uma estação de trabalho DNA Workstation Locus Biotecnologia – Locus do Brasil Ltda, São Paulo, SP, submetido a uma radiação uv de 6,24 J/mL, em comprimento de onda de 256 nm em ambos os lados do frasco em temperatura ambiente. A radiação foi realizada em 30 sessões de 90 segundos. No intervalo de cada sessão, o sangue era homogeneizado lentamente durante 60 segundos, de modo que toda amostra recebesse a mesma quantidade de radiação. Após esse procedimento, o conteúdo da bolsa foi dividido de modo que cada animal recebesse uma alíquota de 50 mL. Esse sangue foi transfundido em bezerros

para posterior avaliação, conforme descrito na segunda etapa deste experimento. Após o término do experimento, carrapatos presentes nos bovinos pertencentes aos grupos I, II e III foram coletados para a pesquisa de esporocinetos conforme técnica descrita por Quintão-Silva & Ribeiro (2003). As análises foram repetidas diariamente do oitavo ao décimo quarto dia de incubação. O objetivo dessa técnica é fazer a identificação de esporocinetos de *Babesia bigemina* na hemolinfa de carrapatos que infectavam os animais após o fim do experimento. Essa técnica pode ser utilizada para auxiliar no diagnóstico da babesiose. A análise estatística foi feita a partir da comparação das medidas entre os grupos foi realizada por meio do teste t para amostras independentes e a comparação dos valores entre o momento inicial e final do estudo foi realizada por meio do teste t para amostras pareadas. Os valores de $p < 0,01$ foram considerados estatisticamente significativos das medidas médias entre os grupos comparados. Os perfis de médias auxiliam na interpretação dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O animal utilizado como doador do sangue para a primeira etapa do experimento apresentou uma parasitemia de 1% no dia da irradiação. Após o tratamento com riboflavina/uv esse sangue foi inoculado nos animais da segunda etapa do experimento. O grau de parasitemia obtido nos animais inoculados está apresentado no Quadro 1. Os resultados do esfregaço corado em lâminas demonstraram uma redução do grau de parasitemia no decorrer do tempo. Essa diminuição pode ter ocorrido pelo período de armazenamento do sangue. Porém, é importante ressaltar que a

sensibilidade desta técnica é baixa. Assim, é possível que o parasita estivesse presente no animal e não tenha sido visualizado em lâmina. Outro fator importante é que dificilmente o parasita é visualizado em lâmina na fase aguda da doença. Esses dados estão de acordo com Krause et al. (1996), Martins et al. (1996) e Pereira et al. (2006), que ainda citam a necessidade de que vários esfregaços sanguíneos corados devam ser examinados para a identificação de *Babesia* sp, já que menos de 1% dos eritrócitos estão parasitados na primeira semana da enfermidade. A Reação de Imunofluorescência Indireta realizada no sangue de bezerro parasitado com *Babesia bigemina* antes e após o uso da Riboflavina associada à luz ultravioleta demonstrou a presença de anticorpos anti*Babesia bigemina*. Esses resultados mostram que a técnica de inativação de patógenos da Riboflavina associada à irradiação ultravioleta preservou os anticorpos presentes na alíquota de sangue. Os resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta estão no Quadro 2 e mostram que os animais apresentaram anticorpos contra *Babesia bigemina* a partir de 14 dias após a inoculação. Isso se deve ao fato que o organismo do animal teve um determinado período de tempo para produzir anticorpos contra o parasita. É importante ressaltar que os animais considerados positivos na RIFI foram aqueles que apresentaram titulação maior que 1/320, demonstrando que esses animais apresentavam uma infecção no momento da análise e não anticorpos de infecções prévias. Três semanas após a inoculação, todos os animais apresentaram anticorpos contra a doença. O confronto das diversas técnicas de diagnóstico para a babesiose realizadas neste estudo comprovou grande sensibilidade da Reação de Imunofluorescência Indireta na detecção

de anticorpos anti*Babesia bigemina*. Esses dados estão de acordo com os verificados por Martins et al. (1996). Demonstram ainda que o tratamento da riboflavina associada com a ultravioleta não foi eficaz na inativação de *Babesia bigemina*. A Quadro 3 mostra os resultados da Reação em Cadeia da Polimerase realizada no sangue de bezerro parasitado com *Babesia bigemina* antes e após ao tratamento com Riboflavina associada a Luz Ultravioleta. Os resultados técnica da qPCR demonstram que não foram identificados fragmentos de DNA de *Babesia bigemina* nas amostras analisadas. Estes resultados contrastam com os resultados obtidos por Pereira et al. (2006) e Buling et. al. (2007), que demonstram uma alta sensibilidade da técnica de qPCR. Segundo Krause et al. (1996), resultados negativos na PCR não significa que as bolsas de sangue conservado não apresentavam o parasita, mas pode ser devido à pequena quantidade de sangue de 0,5 mL utilizada na técnica de PCR. Apenas um animal adoeceu durante a segunda fase do experimento. Esse achado está de acordo com dados de Vidotto & Marana, 2001; Resende & Petroianu, 2002, que relatam que animais esplenectomizados são mais suscetíveis a infecções. A maioria dos animais deste experimento não adoeceu. Isso ocorreu provavelmente devido ao fato de terem sido utilizados animais mestiços da raça Nelore, que é mais resistente a infecções por hemoparasitas do que raças taurinas. Outro fator importante a ser relatado é que alguns animais, sobretudo animais indianos, apresentam mecanismos de inespecíficos de resistência à *Babesia bigemina* pois, segundo Kessler (1983), nestes animais pode ocorrer um controle da parasitemia mesmo antes da formação de anticorpos contra esse protozoário. Não foram observados esporocinetos em esfregaços corados

confeccionados a partir da hemolinfa dos carrapatos que parasitavam os animais deste experimento. Isto ocorreu provavelmente devido à baixa parasitemia encontrada nos bezerros deste experimento.

CONCLUSÕES

Nas condições que esse experimento foi realizado, a verificação da contagem da parasitemia em Esfregaço Sanguíneo Corado, da Reação de Imunofluorescência Indireta e da Reação da Cadeia da Polimerase em tempo real em sangue bovino tratado com Riboflavina associada à Radiação Ultravioleta permitiram chegar às seguintes conclusões: O uso da Riboflavina associado à luz ultravioleta não demonstrou eficácia no controle da *Babesia bigemina*, assim como não danificou os anticorpos contra *Babesia bigemina* presentes nas bolsas de sangue conservadas para transfusão.

Comitê de Ética

Antes da realização desta pesquisa, o projeto deste experimento foi submetido ao comitê de ética para uso de animais da FMVZ-UNESP sob o número do protocolo 75/2009 – CEUA e aprovado em 30/06/2009.

Agradecimentos:

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo aporte financeiro para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G.E.S.; SILVA, R.B. DA; SANTOS FILHO, H.A.; LAZZERI, L.; SANTOS, E.S.; BETEILLE, P.R.B. Esplenectomia em bovino. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Brazil)*. v. 7, n.2, p. 135-138, 1984.
- BRYANT, B.J.; KLEIN, H.G. Pathogen Inactivation: the definitive safeguard for the blood supply. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.131, n.5, p.719-733, 2007.
- BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ASENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBACARRETERO, J.C.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Vet. Parasitol.*, v.147, p.16-25, 2007.
- CALLAHAN, S.M.; WONGANAN, P.; OBENAUER-KUTNER, L.J.; SUTJIPTO, S.; DEKKER, J.D.; CROYLE, M.A Controlled inactivation of recombinant viruses with vitamin B2. *J. Virol. Methods*, n.148, p.132-145, 2008.
- CARDO, L.J.; SALATA, J.; MENDEZ, J.; REDDY, H.; GOODRICH, R. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfus. Apheresis Sci.*, v.37, p. 131–137, 2007.
- GOODRICH, R.; HANSEN, E.; GILMOUR, D.; JESSER, R.; KEIL, S.; GOODRICH, T. Inactivation of pathogens in blood products with riboflavin and light. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION, 26., Vienna. *AUTRICHE*, v.78, suppl.2, p.211-215, 2000.
- JAIN, N.C. *Essentials of veterinary hematology*. Media: Lea e Febinger, 1993. p.133-158.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6.ed. London: Academic Press, 2008. 904p.

KRAUSE, P.J.; TELFORD III, S.; SPIELMAN, A.; RYAN, R.; MAGERA, J.; RAJAN, T.V.; CHRISTIANSON, D.; ALBERGHINI, T.V.; BOW, L.; PERSING, D. Comparison of PCR with Blood Smear and Inoculation of Small Animals for Diagnosis of *Babesia microti* Parasitemia. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, p.2791-2794, 1996.

KESSLER, R.H.; MADRUGA, C.R.; SCHENK, M.A.M.; RIBEIRO, O.C. Babesiose cerebral por *Babesia bovis*, (Babes 1888 e STARCOVICI, 1893) em bezerros no estado do Mato Grosso do Sul. *Pesqui. Agropec. Brás.*, v.18, p.931-935, 1983.

MADRUGA C.R.; KESSLER, R.H.; JESUS, E.F.; SETE, A.J. *Reação de imunofluorescência Indireta para diagnóstico sorológico de Babesia bigemina e Babesia bovis*. Produção de antígenos com cepas isoladas no Estado de Mato Grosso do Sul e avaliação preliminar do teste., *Embrapa-CNPGC*, Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1986. p.1-6. (Pesquisa em Andamento, 32).

MARTINS, J.R.; CORRÊA, B.L.; CERESÉ, V.H. Estudo comparativo entre as provas de ELISA e Imunofluorescência Indireta (IFI) para detectar anticorpos contra *Babesia bovis*. *Ciênci. Rural*, v.26, n.1, p.115-118, 1996.

PEREIRA, D.A.A. *Avaliação e otimização de Reações da Cadeia em Polimerase para diagnóstico molecular e estudo epidemiológico de Babesia bovis*. 2006. 48f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

QUINTÃO-SILVA, M.G.; RIBEIRO, M.F.B. Infection rate of *Babesia* spp. Sporokinetes in Engorged *Boophilus microplus* from an Area of Enzootic Stability in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.98, n.8, p.999-1002, 2003.

REINE, N.J. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.*, v.19, n.2, p.68-74, 2004.

RESENDE, V.; PETROIANU, A. Funções do remanescente esplênico após esplenectomia subtotal para o tratamento de lesões complexas do baço humano. *Rev. Assoc. Méd. Brás.*, v.48, n.1, p.26-31, 2002.

RODRIGUES, A.; RECH, R.R.; BARROS, R.R.; FIGHERA, R.A.; BARROS, C.S.L. Epidemiological aspects of a outbreak of cerebral babesiosis in cattle tick free area. *Ciênci. Rural*, v.38, n.9, p.2646-2649, 2008.

SOLHEIM, B.G.; SEGATCHIAN, J. Update on pathogen reduction technology for therapeutic plasma: an overview. *Transfus. Apheresis Sci.*, v.35, p.83-90, 2006.

TERPSTRA, F.G.; VAN'T WOUT, A.B.; SCHUITMAKER, H. Potentials and limitation of UVC irradiation for the inactivation of pathogens in platelet concentrates. *Transfusion*, v.48, p.304-313, 2008.

TIZARD, I.R. *Imunologia veterinária: uma introdução*. 8.ed. São Paulo: Rocca, 2009. 520p.

TOMCZAK, A.C.T.Q.; GRILO, K.T.M.; CASTRO, J.M.; MACHADO, A.M.B.; LEONART, M.S.S.; NASCIMENTO, A.J. Estudo de métodos laboratoriais para o controle de qualidade de unidades transfusionais eritrocitárias no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar), Brasil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v.32, n.3, p.209-214, 2010.

VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M. Diagnóstico em anaplasmosse bovina. *Ciênci. Rural*, v.31, n.2, p.361-368, 2001.

WARDROP, K.J.; REINE, N.; BIRKENHEUER, A.; HALE, A.; HOHENHAUS, A.; CRAWFORD, C.; LAPPIN, M.R. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *J. Vet. Intern. Med.*, v.19, n.1, p.135-142, 2005.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. *Schalm's veterinary hematology*. 6.ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. 1206p.

Quadro 1. Grau de parasitemia de *Babesia bigemina* no sangue coletado de bezerros mestiços dos grupos 3 (n=2), 4 (n=3) e 5 (n=3). Análises realizadas 7, 14 e 21 dias após a inoculação.

GRUPOS	AOS 7 DIAS APÓS INOCULAÇÃO	AOS 14 DIAS APÓS INOCULAÇÃO	AOS 21 DIAS APÓS INOCULAÇÃO
GRUPO III (E.N.T.)	50% (0,001)	50% (0,001)	100% (-)
GRUPO 4 (H.T.)	100% (-)	100% (-)	33% (0,001)
GRUPO 5 (E.T.)	100% (-)	33% (0,001)	100% (-)

Legenda:

E.N.T.: Bezerros Esplenectomizados que receberam sangue não Tratado;

H.T.: Bezerros Hígidos que receberam sangue Tratado;

E.T.: Bezerros Esplenectomizados que receberam sangue Tratado;

(+) = Parasitemia positiva

(-) = Parasitemia negativa

Quadro 2. Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detectar anticorpos contra *Babesia bigemina* no sangue coletado de bezerros mestiços dos grupos 3 (n=2), 4 (n=3) e 5 (n=3). Análises realizadas 7, 14 e 21 dias após a inoculação.

GRUPOS	AOS 7 DIAS APÓS INOCULAÇÃO	AOS 14 DIAS APÓS INOCULAÇÃO	AOS 21 DIAS APÓS INOCULAÇÃO
GRUPO III (E.N.T.)	100% (-)	50% (+)	50% (+)
GRUPO IV (H.T.)	50% (+)	100% (+)	75% (+)
GRUPO V (E.T.)	33% (+)	100% (-)	100% (+)

Legenda: E.N.T.: Animais Esplenectomizados que receberam sangue Não Tratado;

H.T.: Animais Hígidos que receberam sangue Tratado;

E.T.: Animais Esplenectomizados que receberam sangue Tratado.

(+) = RIFI positiva

(-) = RIFI negativa

Quadro 3. Reação em Cadeia da Polimerase em sangue coletado de bezerros mestiços dos grupos 3 (n=2), 4 (n=3) e 5 (n=3). Avaliação dos animais 7, 14 e 21 dias após a inoculação do sangue parasitado com *Babesia bigemina*.

GRUPO	AOS 7 DIAS APÓS INOCULAÇÃO	AOS 14 DIAS APÓS INOCULAÇÃO	AOS 21 DIAS APÓS INOCULAÇÃO
GRUPO III (E.N.T.)	50% (+)	50% (+)	50% (+)

GRUPO IV (H.T.)	100% (+)	66% (+)	100% (+)
GRUPO V (E.T.)	100% (-)	100% (-)	100% (-)

Legenda: E.N.T.: Animais Esplenectomizados que receberam sangue Não Tratado;

H.T.: Animais Hígidos que receberam sangue Tratado;

E.T.: Animais Esplenectomizados que receberam sangue Tratado.

(+) = qPCR positiva

(-) = qPCR negativa

Quadro 1. Valores da Contagem Total de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), média dos dias e desvio padrão de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 do Grupo 1 (Controle).

BOLSA	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 9	DIA 12	DIA 15	DIA 18	DIA 21
GI/01	5,99	5,99	4,62	4,39	4,38	4,71	4,84	4,62
GI/02	5,75	5,75	4,76	4,00	4,25	4,53	4,78	4,53
GI/03	6,13	6,14	7,34	5,26	6,34	4,26	4,27	4,83
GI/04	6,16	6,16	5,47	5,21	5,47	4,51	4,84	4,19
GI/05	6,05	6,05	7,19	5,06	4,71	4,69	5,75	4,52
GI/06	6,60	6,60	7,01	6,83	5,80	5,00	4,58	4,93
GI/07	6,85	6,85	5,01	4,97	5,02	5,66	4,68	4,86
GI/08	5,98	5,61	6,01	4,48	5,39	5,29	4,42	4,14
MÉDIA GI	6,19	6,14	5,93	5,02	5,17	4,83	4,77	4,58
DP	359,66	410,50	1127,03	853,78	718,01	460,19	445,13	296,83

Quadro 2. Valores da Contagem total de hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), média dos dias e desvio padrão de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 do Grupo 2 (*Babesia bigemina*).

BOLSA	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 9	DIA 12	DIA 15	DIA 18	DIA 21
GII/01	2,710	2,780	2,670	1,730	1,050	2,080	2,050	2,150
GII/02	2,240	2,400	2,280	0,990	0,670	1,390	1,030	1,180
GII/03	1,960	1,670	1,960	1,770	0,860	0,940	0,770	0,660
GII/04	2,070	2,130	2,000	1,550	0,860	0,926	0,800	0,910
GII/05	2,150	1,740	1,880	1,230	0,560	0,520	0,600	0,460
GII/06	1,940	1,780	1,850	1,500	0,600	0,820	0,590	0,800
GII/07	1,910	1,890	2,050	1,630	0,770	0,760	0,770	0,650
GII/08	1,950	1,740	1,890	2,370	0,990	0,920	0,670	0,750
MÉDIA GII	2,12	2,02	2,07	1,47	0,79	1,04	0,91	0,94
DP	266,40	394,20	277,32	351,41	177,68	483,81	481,28	530,63

Quadro 3. Valores da Concentração da Hemoglobina (g/dL), média dos dias e desvio padrão de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 do Grupo 1 (Controle).

BOLSA	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 9	DIA 12	DIA 15	DIA 18	DIA 21
GI/01	8,30	9,40	8,30	10,90	8,00	8,00	8,30	8,40
GI/02	10,50	9,00	9,30	9,00	8,30	8,20	9,10	8,40
GI/03	11,10	9,70	11,80	11,30	9,80	9,30	9,50	9,10
GI/04	6,70	9,80	9,80	9,50	8,20	8,50	8,80	8,20
GI/05	10,70	9,50	9,30	9,60	8,50	8,30	8,50	8,30
GI/06	12,60	10,50	10,90	9,80	8,50	8,70	8,90	9,20
GI/07	11,00	11,00	11,00	9,90	8,60	8,50	8,50	8,50
GI/08	10,00	9,50	10,10	10,40	9,60	9,30	9,30	9,80
MÉDIA GI	10,11	9,80	10,06	10,05	8,69	8,60	8,86	8,74
DP	1,83	0,65	1,13	0,77	0,66	0,48	0,42	0,57

Quadro 4. Valores da Concentração da Hemoglobina (g/dL), média dos dias e desvio padrão de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 do Grupo 2 (*Babesia bigemina*).

BOLSA	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 9	DIA 12	DIA 15	DIA 18	DIA 21
GII/01	3,80	3,78	3,90	3,60	2,90	4,30	4,20	4,00
GII/02	3,30	3,40	3,50	3,40	3,40	3,30	3,50	3,40
GII/03	2,90	3,67	3,10	3,20	3,30	3,40	3,60	3,40
GII/04	3,10	3,13	3,30	3,30	3,40	3,30	3,50	3,20
GII/05	3,20	2,74	2,90	3,10	2,80	3,30	2,80	2,80
GII/06	2,90	2,78	2,90	3,10	3,10	3,20	3,20	2,90
GII/07	2,90	2,89	3,10	3,00	3,10	3,00	3,20	3,20
GII/08	2,90	2,74	2,90	3,12	3,10	2,90	3,10	3,00
MÉDIA GII	3,13	3,14	3,20	3,23	3,14	3,34	3,39	3,24
DP	0,32	0,43	0,35	0,20	0,22	0,42	0,42	0,38

Quadro 5. Valores do Volume Globular (%), média dos dias e desvio padrão de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 do Grupo 1 (Controle).

BOLSA	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 9	DIA 12	DIA 15	DIA 18	DIA 21
GI/01	24	27	24	24	26	25	24	24
GI/02	31	26	24	24	23	22	23	23
GI/03	31	28	27	26	26	25	24	24
GI/04	29	28	22	24	24	23	23	23
GI/05	31	27	24	24	25	24	23	24
GI/06	36	30	25	24	25	25	23	24
GI/07	31	32	28	27	25	24	24	23
GI/08	28	27	23	24	25	24	25	24
MÉDIA GI	30,1	28,1	24,6	24,6	24,9	24	23,6	23,6
DP	3,40	1,96	1,99	1,19	0,99	1,07	0,74	0,52

Quadro 6. Valores do Volume Globular (%), média dos dias e desvio padrão de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 do Grupo2 (*Babesia bigemina*).

BOLSA	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 9	DIA 12	DIA 15	DIA 18	DIA 21
GII/01	15	13	12	10	10	9	9	9
GII/02	16	13	11	9	9	10	10	10
GII/03	10	10	9	9	9	10	9	10
GII/04	12	10	9	9	9	10	10	10
GII/05	13	11	10	9	8	9	9	9
GII/06	11	11	9	9	8	10	10	9
GII/07	13	11	9	9	8	9	10	10
GII/08	10	10	9	8	8	9	9	10
MÉDIA GII	12,5	11,1	9,7	9	8,6	9,5	9,5	9,6
DP	2,20	1,25	1,16	0,53	0,74	0,53	0,53	0,52

Quadro 7. Valores de Proteína Plasmática Total (g/dL), média dos dias e desvio padrão de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 do Grupo 1 (Controle).

BOLSA	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 9	DIA 12	DIA 15	DIA 18	DIA 21
GI/01	6,8	6,4	5,4	5,4	5,4	5,6	5,4	5,4
GI/02	6,6	6,6	5,4	5,6	5,0	5,6	5,4	5,6
GI/03	6,0	6,8	5,6	5,8	5,4	5,6	5,6	5,8
GI/04	6,8	6,4	5,2	5,8	5,2	5,6	5,2	5,8
GI/05	6,8	6,4	5,2	5,8	5,2	5,6	5,2	5,8
GI/06	6,0	6,6	5,4	5,8	5,4	5,8	5,4	5,8
GI/07	6,8	6,6	5,2	5,6	5,2	5,6	5,2	5,6
GI/08	6,0	6,8	5,2	5,8	5,6	5,8	5,2	5,8
MÉDIA GI	6,5	6,6	5,4	5,7	5,3	5,6	5,3	5,7
DP	0,40	0,17	0,15	0,15	0,18	0,09	0,15	0,15

Quadro 8. Valores de Proteína Plasmática Total (g/dL), média dos dias e desvio padrão de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 do Grupo 2 (*Babesia bigemina*).

BOLSA	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 9	DIA 12	DIA 15	DIA 18	DIA 21
GII/01	4,0	4,2	4,0	4,0	4,0	4,2	4,2	4,2
GII/02	3,8	4,0	4,0	4,0	4,0	3,8	4,0	4,2
GII/03	3,8	4,0	3,6	4,0	4,0	3,8	4,0	3,8
GII/04	3,6	4,0	3,6	3,8	4,0	3,8	3,8	3,6
GII/05	3,6	4,0	3,4	3,6	3,8	3,6	4,0	3,4
GII/06	3,4	3,8	3,4	3,8	3,8	3,6	3,6	3,4
GII/07	3,6	3,8	3,4	3,4	3,8	3,6	3,4	3,4
GII/08	3,5	3,8	3,2	3,4	3,6	3,6	3,4	3,4
MÉDIA GII	3,7	3,9	3,6	3,7	3,9	3,7	3,8	3,7
DP	0,19	0,14	0,29	0,26	0,15	0,21	0,30	0,35

Quadro 9. Valores de Fibrinogênio (mg/dL), média dos dias e desvio padrão de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 do Grupo 1 (Controle).

BOLSA	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 9	DIA 12	DIA 15	DIA 18	DIA 21
GI/01	600	400	400	400	400	200	200	200
GI/02	200	200	200	200	200	200	200	200
GI/03	600	400	400	400	400	400	400	400
GI/04	400	400	400	400	400	400	400	400
GI/05	400	400	400	200	200	400	400	400
GI/06	400	400	400	400	400	400	400	400
GI/07	600	400	400	400	400	200	200	200
GI/08	400	400	400	400	400	200	200	200
MÉDIA GI	450	375	375	350	350	300	300	300
DP	141,4	70,7	70,7	92,6	92,6	106,9	106,9	106,9

Quadro 10. Valores de Fibrinogênio (mg/dL), média dos dias e desvio padrão de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 do Grupo 2 (*Babesia bigemina*).

BOLSA	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 9	DIA 12	DIA 15	DIA 18	DIA 21
GII/01	600	400	600	200	400	200	200	200
GII/02	600	400	600	600	600	600	600	400
GII/03	600	600	600	600	600	400	200	200
GII/04	400	600	600	600	600	200	600	200
GII/05	400	600	400	600	400	200	200	200
GII/06	400	600	600	600	400	400	400	400
GII/07	600	400	600	600	600	200	200	200
GII/08	400	600	400	600	400	200	200	200
MÉDIA GII	500	525	550	550	500	300	325	250
DP	106,9	103,5	92,6	141,4	106,9	151,2	183,2	92,6

Quadro 11. Valores da Contagem Total de leucócitos (leucócitos/mm³), média dos dias de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 do Grupo 1 (Hígido).

BOLSA	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 9	DIA 12	DIA 15	DIA 18	DIA 21
GI/01	14.210	11.040	9.200	9.760	6.100	4.900	4.890	4.600
GI/02	14.960	18.600	12.800	12.300	11.900	6.100	5.900	5.890
GI/03	15.360	14.680	13.000	12.700	11.780	11.600	11.560	11.340
GI/04	14.100	13.040	13.400	12.900	10.800	9.100	8.900	8.780
GI/05	16.240	14.640	13.680	12.000	11.900	11.600	11.760	11.350
GI/06	18.160	16.860	15.920	12.100	11.300	10.700	9.890	9.460
GI/07	16.320	16.140	15.840	14.900	13.700	12.900	12.100	11.340
GI/08	12.240	11.440	11.720	11.500	11.200	11.800	11.400	8.780

Quadro 12. Valores da Contagem Total de leucócitos (leucócitos/mm³), média dos dias de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses provenientes de Campo Grande, MS, nos oito momentos de análise do sangue conservado em CPDA-1 do Grupo 2 (*Babesia bigemina*).

BOLSA	DIA 0	DIA 3	DIA 6	DIA 9	DIA 12	DIA 15	DIA 18	DIA 21
GII/01	23.000	18.100	14.800	13.900	11.200	11250	11.000	10.400
GII/02	28.100	16.800	14.100	13.200	13.000	12980	12.800	12.400
GII/03	16.200	14.400	13.600	12.900	12.100	11930	11.600	11.500
GII/04	17.400	11.600	12.000	11.960	11.800	11790	11.700	11.570
GII/05	17.100	14.700	14.400	13.500	10.800	10340	8.900	9.900
GII/06	13.800	10.900	10.800	10.450	10.370	10350	10.300	9.400
GII/07	20.400	19.800	18.100	17.600	15.000	12890	12.300	11.300
GII/08	23.700	22.000	20.500	18.300	16.000	13340	12.400	10.600

Quadro 13. Comparação dos valores médios, desvio padrão e valores de p. Da análise do sangue de bezerros mestiços, com idade entre oito e 12 meses provenientes de Campo Grande, MS, no primeiro e último dia de análise do sangue conservado em CPDA-1 dos grupos 1 e 2.

	Grupo	N	Média	Desv. Pad	p-valor
Contagem total de Hemácias (dia 0)	1	8	6188,8	359,7	<0,001
	2	8	2116,3	266,4	
Contagem total de Hemácias (dia 21)	1	8	4577,5	296,8	<0,001
	2	8	945,0	530,6	
Hemoglobina (dia 0)	1	8	10,1	1,8	<0,001
	2	8	3,1	0,3	
Hemoglobina (dia 21)	1	8	8,7	0,6	<0,001
	2	8	3,2	0,4	
Hematócrito (dia 0)	1	8	30,1	3,4	<0,001
	2	8	12,5	2,2	
Hematócrito (dia 21)	1	8	23,6	0,5	<0,001
	2	8	10,1	0,8	
Proteína Plasmática Total (dia 0)	1	8	6,5	0,4	<0,001
	2	8	3,7	0,2	
Proteína Plasmática Total (dia 21)	1	8	5,7	0,2	<0,001
	2	8	3,7	0,4	
Contagem total de Leucócitos (dia 0)	1	8	15198,8	1778,1	0,026
	2	8	19962,5	4728,3	
Contagem total de Leucócitos (dia 21)	1	8	8942,5	2557,6	0,065
	2	8	10883,8	986,1	
Sódio (dia 0)	1	8	200,9	23,9	0,008
	2	8	171,5	12,4	
Sódio (dia 21)	1	8	172,4	23,1	0,003
	2	8	138,1	13,1	
Potássio (dia 0)	1	8	4,0	0,3	<0,001
	2	8	3,0	0,4	
Potássio (dia 21)	1	8	6,0	0,9	<0,001
	2	8	4,2	0,3	
Lactato (dia 0)	1	8	4,0	0,9	<0,001
	2	8	19,9	1,3	
Lactato (dia 21)	1	8	15,4	4,1	0,010
	2	8	19,9	1,0	

Quadro 14. Comparação das avaliações das bolsas de sangue entre os momentos inicial e final.

	Grupo1	Grupo 2
Hemácia dia 0 X Hemácia dia 21	<0,01	<0,01
Hemoglobina dia 0 X Hemoglobina dia 21	0,051	0,259
Hematócrito dia 0 X Hematócrito dia 21	0,01	0,01
Proteína dia 0 X Proteína dia 21	0,03	0,867
Leucócitos dia 0 X Leucócitos dia 21	<0,01	0,01
Sódio dia 0 X Sódio dia 21	0,01	<0,01
Potássio dia 0 X Potássio dia 21	<0,01	<0,01
Lactato dia 0 X Lactato dia 21	<0,01	0,998

Quadro 15. Valores Médios de Referência em bovinos (KANEKO, 2008; WEISS e WARDROP, 2010).

PARÂMETRO	VALORES	UNIDADE
Número de Hemácias	5-10 x 10 ⁶	Milhões de células/mm ³
Concentração da Hemoglobina	8-15	g/dL
Volume Globular	24-46	%
Proteína Plasmática Total	7-8,5	g/dL
Fibrinogênio	300-700	mg/dL
Número de Leucócitos	4.000-12.000	Leucócitos/mm ³
Sódio	132-152	mmol/L
Potássio	3,9-5,8	mmol/L
Lactato	0,56-2,22	mmol/L