



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA.

MILENA MELO SILVA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* e HEMÓLISE
COMO INTERFERENTE NO PERFIL BIOQUÍMICO DE VACAS LEITEIRAS DO
SERTÃO CENTRAL DO CEARÁ**

MOSSORÓ

2022

MILENA MELO SILVA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* e HEMÓLISE
COMO INTERFERENTE NO PERFÍL BIOQUÍMICO DE VACAS LEITEIRAS DO
SERTÃO CENTRAL DO CEARÁ**

Monografia apresentada a Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em MEDICINA VETERINÁRIA.

Orientadora: Michelly Fernandes de Macedo, Profa. Dra.

Co-orientadora: Juliana Fortes Vilarinho Braga, Profa. Dra.

MOSSORÓ

2022

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

S587d Silva, Milena Melo.

Detecção molecular de Babesia bigemina e Babesia bovis e hemólise como interferente no perfil bioquímico de vacas leiteiras do sertão central do Ceará / Milena Melo Silva. -2022.
49 f. : il.

Orientadora: Michelly Fernandes de Macedo.
Coorientadora: Juliana Fortes Vilarinho Braga.
Monografia (graduação) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Curso de Medicina Veterinária, 2022.

1. Babesia bigemina. 2. Babesia bovis. 3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). 4. Bioquímica. 5. Hemólise. I. Macedo, Michelly Fernandes de, orient. II. Braga, Juliana Fortes Vilarinho, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

MILENA MELO SILVA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* e HEMÓLISE
COMO INTERFERENTE NO PERFÍL BIOQUÍMICO DE VACAS LEITEIRAS DO
SERTÃO CENTRAL DO CEARÁ**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
MEDICINA VETERINÁRIA..

Defendida em: 28 / 11 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Michelly Fernandes de Macedo, Prof. Dra. (UFERSA)
Presidente e Orientadora

Juliana Fortes Vilarinho Braga, Prof. Dra. (UFERSA)
Co-orientadora

Bruno Vinícios Silva de Araújo
Médico Veterinário, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

Dedico este trabalho ao meu avô materno
Benedito Luiz, ao meu bisavô materno
Francisco Ferreira, à minha bisavó materna
Maria Dasdores e à minha avó paterna
Francisca Ana (*In Memoriam*).

Aos meus pais, irmã, namorado e a toda minha
família que, com muito carinho e apoio, não
mediram esforços para que eu chegasse até esta
etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por me proporcionar saúde e força para realizar este trabalho.

Aos meus pais, Weid Maria de Melo e Francisco Luiz Rossino da Silva, que sempre estiveram ao meu lado, me proporcionando todo o suporte emocional e financeiro durante a minha trajetória na graduação. À vocês, toda a minha gratidão e amor.

Á minha irmã, Wilsynnara Melo da Silva Lira, por todos os ensinamentos sobre a vida e pelo apoio as minhas escolhas. Gratidão por me presentear com minha sobrinha Lis, luz na minha vida e que eu tanto amo.

Ao meu namorado e amigo, João Victor da Silva Moura, por me compreender, me lembrar todos os dias da minha capacidade e por todo amor dedicado.

Á minha Orientadora, Michelly Fernandes de Macedo, pela dedicação incansável e por toda confiança depositada a mim, tornando possível a realização do meu trabalho e de outros sonhos.

À toda minha família, pelo apoio e carinho, estimulando as minhas decisões em busca dos meus sonhos. Gratidão por compreenderem minha ausência em diversos momentos de suas vidas.

Aos meus amigos, em especial à Victória Moraes, Monaliza Vital, Fernando Lucas, Thylara Letícia, Máyron Silva e Bruno Vinícios, pelos momentos divididos ao longo da minha graduação, sejam eles de alegria ou de tristeza. Vocês são minha segunda família.

Á todos os colaboradores da pesquisa, que contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelo interesse e disponibilidade.

Por fim, agradeço à Universidade Federal Rural do Semi-Árido - campus Mossoró, pelas oportunidades e vivências durante toda a minha graduação.

É justo que muito custe o que muito vale.

Santa Teresa D'Ávila

RESUMO

Com o crescimento da bovinocultura de leite brasileira, surge a necessidade de um acompanhamento mais detalhado de fatores como o controle e identificação de doenças no rebanho. Os mais diversos métodos de diagnósticos laboratoriais podem ser utilizados, dentre eles, as análises de parâmetros bioquímicos séricos e técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Neste trabalho, objetivou-se determinar a ocorrência de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* utilizando diagnóstico molecular e analisar a interferência da hemólise no perfil bioquímico sérico em vacas leiteiras do sertão central do Ceará. Foram avaliados os parâmetros bioquímicos de 187 vacas leiteiras (proteínas totais, albumina, creatinina, ureia, triglicerídeos, colesterol, cálcio e fósforo), de acordo com o grau de hemólise e analisando a interferência da presença de hemoglobina nos resultados. Para o diagnóstico molecular dos agentes, foram selecionados 60 animais, aleatoriamente, para extração do material genômico e realização de PCR convencional direcionada ao gene SS rRNA de *B. bigemina* e *B. bovis*. Para as análises estatísticas dos resultados da análise do perfil bioquímico sérico foi utilizado o pacote estatístico do SAS (9.3), foram comparados pelo teste Tukey quando a comparação foi entre todos os graus de hemólise e o teste F da análise de variância para comparação entre os graus leve e acentuada. Diferenças nos valores de proteínas totais, fósforo, triglicerídeos e colesterol foram observadas, permitindo inferir que houve influência dentre os parâmetros pela ocorrência de hemólise, e que o grau desse interferente foi um fator determinante para os dois últimos analitos citados. Dos animais analisados, houve detecção do material genético de *B. bigemina* em 15% (9/60) e de *B. bovis* em 10% (6/60). A positividade dos animais confirma a presença de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em rebanhos leiteiros do sertão central do Ceará, contribuindo para caracterização epidemiológica da doença no estado.

Palavras-chave: *Babesia bigemina*; *Babesia bovis*; Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); Bioquímica; Hemólise.

ABSTRACT

With the growth of the Brazilian dairy cattle industry, there is the need for a more detailed monitoring of factors such as the control and identification of diseases in the herd. The most diverse methods of laboratory diagnosis can be used, among them, the analysis of serum biochemical parameters and molecular techniques such as Polymerase Chain Reaction (PCR). In the present study, the objective was to determine the occurrence of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* using molecular diagnosis and to analyze the interference of hemolysis in the serum biochemical profile in dairy cows from the central highlands of Ceará. The biochemical parameters of 187 dairy cows (total proteins, albumin, creatinine, urea, triglycerides, cholesterol, calcium and phosphorus) were evaluated according to the degree of hemolysis and analyzing the interference of the presence of hemoglobin in the results. For the molecular diagnosis of the agents, 60 animals were randomly selected for extraction of genomic material and conventional PCR directed to the SS rRNA gene of *B. bigemina* and *B. bovis*. For the statistical analysis of the results of the serum biochemical profile analysis, the statistical package of SAS (9.3) was used, and they were compared by the Tukey test when the comparison was between all degrees of hemolysis and the F test of the analysis of variance for comparison between the mild and accentuated degrees. Differences in the values of total protein, phosphorus, triglycerides, and cholesterol were observed, allowing us to infer that there was influence among the parameters by the occurrence of hemolysis, and that the degree of this interference was a determining factor for the last two analytes mentioned. From the analyzed animals, there was detection of *B. bigemina* genetic material in 15% (9/60) and *B. bovis* in 10% (6/60). The positivity of the animals confirms the presence of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in dairy herds in the central sertao of Ceará, contributing to the epidemiological characterization of the disease in the state.

Keywords: *Babesia bigemina*; *Babesia bovis*; Polymerase Chain Reaction (PCR); Biochemistry; Hemolysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Classificação visual do grau de hemólise presente no soro de vacas leiteiras no Laboratório de Diagnósticos em Patologia Clínica Veterinária, UFERSA, 2022. Microtubos com alíquotas de soro bovino; G0: amostra sem a presença de hemólise; G1: amostra com grau leve de hemólise; G2: amostra com grau acentuado de hemólise.....30
- Figura 2 – Detecção do gene SS rRNA de *B. bigemina* por PCR convencional em vacas leiteiras do sertão central do Ceará, 2021/2022. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de etídio; L: marcador de peso molecular, 100pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo; 2, 7, 19, 22, 26, 28, 31, 34 e 35: amplificação de um fragmento de aproximadamente 685pb específico do gene SS rRNA de *B. bigemina* 36
- Figura 3 – Detecção do gene SS rRNA de *B. bovis* por PCR convencional em vacas leiteiras do sertão central do Ceará, 2021/2022. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de etídio; L: marcador de peso molecular, 100pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo; 20, 21, 22 e 24: : amplificação de um fragmento de aproximadamente 541pb específico do gene SS rRNA de *B. bovis*..... 37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	–	Registros da prevalência de <i>Babesia bigemina</i> e <i>Babesia bovis</i> no Brasil.....	20
----------	---	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Sequência de iniciadores utilizados na PCR para detecção de <i>Babesia bigemina</i> e <i>Babesia bovis</i> , com seus respectivos genes-alvo, programa de amplificação, tamanho do produtos e referência.....	31
Tabela 2	– Valores médios, coeficientes de variação e o valor-p (significância) das concentrações séricas dos analitos nas amostras classificadas de acordo com grau de hemólise.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca	Cálcio
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
DEPEC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dL	Gestão da Informação
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
g	Grama
mg	Miligrama
mL	Mililitro
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
nPCR	<i>Nested</i> PCR
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
TPB	Tristeza Parasitária Bovina
UV	Radiação ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Tristeza parasitária bovina	18
2.1.1	Etiologia e epidemiologia.....	18
2.1.2	Transmissão e ciclo biológico	21
2.1.3	Patogenia e sinais clínicos.....	22
2.1.4	Diagnóstico.....	23
2.2	Perfil bioquímico sérico.....	24
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	Objetivo geral.....	28
3.2	Objetivos específicos.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1	Área de estudo.....	29
4.2	Coletas e processamento das amostras.....	29
4.3	Mensuração dos parâmetros bioquímicos.....	30
4.4	Extração de DNA e PCR.....	30
4.5	Análise estatística.....	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1	Parâmetros bioquímicos e a interferência da hemólise.....	33
5.2	Detecção molecular de <i>Babesia bigemina</i> e <i>Babesia bovis</i>.....	36
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
7	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite brasileira é composta por pequenos e médios produtores que entregam para o mercado cerca de 34 milhões de litros de leite por ano e ocupam o terceiro lugar na produção mundial (MAPA, 2022). Com o crescimento acelerado do setor e ambiente produtivo desuniforme, obteve-se a necessidade de um acompanhamento mais detalhado de fatores como o controle e identificação de doenças no rebanho e de medidas para aumentar a eficiência dos serviços de assistência técnica, garantindo a sanidade e o bem-estar dos animais (VILELA e RESENDE, 2014).

A manifestação de doenças parasitárias ou infecciosas, no rebanho bovino leiteiro, pode ocasionar grandes perdas econômicas ao interferir nos processos responsáveis pela conversão dos fatores de produção em produtos de origem animal, em decorrência de sua capacidade em alterar a quantidade e qualidade do leite (PAZINATO et al., 2016; STOTZER et al., 2014). Parâmetros laboratoriais fazem parte da avaliação da sanidade e bem-estar animal, incluídos como meios avaliativos da saúde, que interfere diretamente nesses aspectos (CONCEA, 2018).

Os mais diversos métodos de diagnósticos laboratoriais podem ser utilizados para o monitoramento e identificação de doenças. As análises do perfil bioquímico sérico, podem indicar alterações no funcionamento dos órgãos e injúrias aos tecidos, sendo então, grandes aliadas considerando que as doenças metabólicas são relativamente frequentes na espécie bovina, especialmente, em animais no período de lactação, que expressam diversas alterações no metabolismo e no perfil hormonal, em decorrência dessa fase (GONZÁLEZ e SCHEFFER, 2003; PAIANO et al., 2019; TOLENTINO, 2019).

Técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR), permitem a identificação de animais assintomáticos que não são diagnosticados devido à reduzida sensibilidade dos outros métodos diretos utilizados, como o esfregaço sanguíneo (GREEN e SAMBROOK, 2019). Pequenas quantidades de DNA são necessárias para amplificação e detecção, dessa forma, proporcionam alta sensibilidade e o diagnóstico efetivo, evitando a manutenção do ciclo de agentes infecciosos como *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, causadores da tristeza parasitária bovina (TPB) nos rebanhos (FERREIRA, 2019). A TPB consiste na identificação de hemoparasitoses de forma concomitante no organismo do animal, formando um complexo de doenças, destacando-se como as mais frequentes a Babesiose e Anaplasmosse. A doença ocasiona altas taxas de mortalidade e morbidade nos rebanhos bovinos,

em decorrência do comprometimento da função das hemácias e de suas consequências (LUIZ et al., 2021; SILVA et al., 2021).

Tendo em vista a importância de promover sanidade e bem-estar animal na bovinocultura de leite, torna-se evidente que o uso de métodos analíticos laboratoriais e técnicas de diagnóstico com maior sensibilidade e especificidade são ferramentas de avaliação da saúde que fornecem informações seguras, colaborando para o estabelecimento de um manejo e controle profilático adequados nos rebanhos. Considerando a escassez de estudos referentes à ocorrência de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* no estado do Ceará e da interferência da hemólise nos parâmetros bioquímicos, objetivou-se com essa pesquisa determinar a ocorrência desses protozoários utilizando diagnóstico molecular e, além disso, analisar o perfil bioquímico sérico em vacas leiteiras do sertão central do Ceará.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tristeza Parasitária Bovina

2.1.1 Etiologia e epidemiologia

A tristeza parasitária bovina no Brasil é definida como uma síndrome clínica causada, principalmente, por três agentes etiológicos distintos, a *Anaplasma marginale*, a *Babesia bovis* e a *Babesia bigemina*, que culminam nos mesmos sinais clínicos e características epidemiológicas (DIERINGS e WILMSEN, 2021; MANICA, 2013). Os protozoários intraeritrócitários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* fazem parte do gênero *Babesia*, ordem Piroplasmida e família Babesiidae (LEVINE, 1971; SCHNITTGER, 2022).

Em 1888, Victor Babes observou inclusões nos eritrócitos de bovinos, classificando-as como bactérias intraeritrócitárias (*Haematococcus bovis*), e relacionando com a manifestação da doença hemoglobinúria enzoótica bovina. Após cinco anos, Smith e Kilborne (1893) associaram a Febre do Texas com a hemoglobinúria enzoótica bovina, provocada pelo protozoário que denominaram *Pyrosoma bigemina*. Devido à similaridade entre os microrganismos, Starcovici em 1893 propôs a fusão do *Haematococcus bovis* e *Pyrosoma bigemina* para o gênero *Babesia* (GANZINELLI et al., 2018; ROMERO, 2021).

Babesia bigemina é caracterizada como uma grande Babesia, pleomórfica e geralmente identificada pela visualização de estruturas nas hemácias semelhantes a uma pera em um ângulo reto quando unidas. Diferentemente, *Babesia bovis* é um protozoário pleomórfico pequeno, apresenta-se como um único corpúsculo, corpúsculos pequenos circulares ou como corpúsculos também dispostos em formato de pera (TAYLOR, 2017).

O primeiro caso de TPB no país, ocorreu em 1901, no Rio de Janeiro, com a aquisição de animais oriundos do exterior. Atualmente, é relatada em diversas regiões do Brasil, mas foi observado que a presença e circulação desses agentes é limitada em animais com alta porcentagem genética de *Bos taurus* (BRITO et al., 2019; SILVA et al., 2021). A doença apresenta estabilidade enzoótica entre os paralelos 32°N e 32°S, ou seja, nessas áreas existe um equilíbrio entre imunidade e patologia. O principal fator determinante para a estabilidade enzoótica é a correlação entre as condições climáticas de cada região e a consequente presença dos vetores, como carrapatos e moscas (GASPAR et al., 2018; RIET et al., 2007). Nas áreas

livres da doença, são observadas condições climáticas desfavoráveis para presença e desenvolvimento dos vetores, não ocorrendo a transmissão da TPB e a formação de imunidade.

As regiões mais secas como nos estados da Paraíba e do Sergipe, além do extremo sul do Rio Grande do Sul e centro-sul do Paraná, demonstram instabilidade enzoótica, onde são observados surtos da doença, apresentando uma frequência de anticorpos nos animais inferior a 75% (MAHONEY e ROSS, 1972; BAHIA et al., 2020; MARÇAL, 2020).

A TPB possui capacidade infectante em animais de qualquer idade, sexo e raça, porém, é observada uma maior susceptibilidade nos bezerros em decorrência de sua fragilidade imunológica (MOLENTO, 2020). A genética relacionada às raças representa outro aspecto significativo nesse processo, rebanhos de sangue europeu são mais susceptíveis aos vetores e a infecção por agentes causadores da TPB, enquanto animais zebuínos demonstram maior resistência, por exemplo. O estresse ambiental, o manejo da pastagem e o tipo de pastagem também podem influenciar a susceptibilidade (HELLU e REZENDE, 2020; DAVID, 2021).

Os agentes causadores dessa síndrome clínica são relatados no Sudeste (FRANQUE et al., 2010; VESPASIANO, 2016; MENDES et al., 2016; AFONSO, 2019; BAHIA et al., 2020); Sul (LAGRANHA et al., 2017; KEMER, 2020); Nordeste (COSTA et al., 2011; SANTOS et al., 2017; VIEIRA, 2021; SILVA et al., 2022); Norte (GUEDES JÚNIOR, 2008; TRINDADE, 2010; BRITO et al., 2013; SILVA et al., 2014) e Centro-Oeste (MADRUGA et al., 1987; MARTINS et al., 2022). Apesar de possuir clima propício para proliferação do principal vetor da doença, o Centro-Oeste apresenta escassez em estudos epidemiológicos na região (COSTA et al., 2021). Os valores de prevalência variam entre as regiões, influenciados pelas diferenças entre as populações estudadas e métodos diagnósticos utilizados, conforme Quadro 1.

Quadro 1 – Registros da prevalência de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* no Brasil.

População analisada	Local	Frequência por agente (%)	Método de diagnóstico	Referências
Sudeste				
Bovinos em lactação	Mesorregião Sul Espírito-santense/ES	B. bovis (98,4%) B. bigemina (96,7%)	ELISA ¹	Franque et al. (2010)
Bovinos jovens em fase de aleitamento	Mesorregião Sul Espírito-santense/ES	B. bovis (75,5%) B. bigemina (78,5%)	ELISA	Franque et al., (2010)
Bovinos jovens em fase de aleitamento	Uberaba/MG	B. bovis (11,3%) B. bigemina (4,3%)	ELISA	Afonso (2019)
Bovinos jovens em fase de aleitamento	Inhaúma/MG	B. bovis (93,33%) B. bigemina (83,33%)	RIFI ²	Vespasiano (2016)
Bovinos jovens em fase de aleitamento	Região noroeste de Minas Gerais/MG	B. bovis (4%) B. bigemina (15,33%)	PCR ³	Bahia et al. (2020)
Bovinos em diversas fases de vida	Oeste Catarinense/ES	B. bovis (33%) Babesia sp. (11%)	Necropsia	Mendes et al. (2010)
Sul				
Bovinos em diversas fases de vida	Fronteira Oeste/RS	B. bovis (0,65%) B. bigemina (4,25%)	Esfregaço sanguíneo	Lagranha (2017)
Bovinos em lactação	Planalto Catarinense/SC	Babesia sp. (25,9%)	Esfregaço sanguíneo	Kemer (2020)
Nordeste				
Bovinos jovens em fase de aleitamento	Petrolina e Ouricuri/PE	B. bovis (42,6%) B. bigemina (37,1%)	RIFI	Santos et al. (2017)
Bovinos em lactação	Olho D'água do Casado/Al	B. bigemina (23%)	Esfregaço sanguíneo	Vieira (2021)
Bovinos em diversas fases de vida	São Sebastião do Passé/BA	Babesia sp. (63,7%)	Esfregaço sanguíneo	Silva et al. (2022)
Bovinos em diversas fases de vida	Mesorregião do Sertão Paraibano/PB	Babesia sp. (79%) B. bigemina (8,3%)	Esfregaço sanguíneo	Costa et al. (2011)
Norte				
Bovinos em diversas fases de vida	Castanhal e São Miguel do Guamá/PA	B. bovis (98,8%) B. bigemina 99,2%)	ELISA	Guedes Júnior (2008)
Bovinos em diversas fases de vida	Mesorregião do Sudeste do Pará/PA	B. bovis (97,3%) B. bigemina (97,3%)	ELISA	Silva et al. (2014)

Bovinos jovens em fase de aleitamento	Araguaína/TO	B. bovis (91,7%) B. bigemina (90,5%)	ELISA	Trindade (2010)
Bovinos em diversas fases de vida	Rondônia/RO	B. bovis (95,11%)	PCR	Brito et al. (2013)
Bovinos em diversas fases de vida	Acre/AC	B. bovis (96,11%)	PCR	Brito et al. (2013)
Centro-Oeste				
Bovinos jovens em fase de aleitamento	Mato Grosso do Sul/MS	B. bovis (100%) B. bigemina (100%)	RIFI	Madruga et al. (1987)
Bovinos jovens em fase de aleitamento	Água Clara/MS	B. bigemina (15%)	ELISA	Martins et al. (2022)

Fonte: Elaborada pelo autor.

¹Ensaio imunoenzimático; ²Imunofluorescência indireta; ³Reação em Cadeia da Polimerase;

Ferreira et al. (2022), ao realizar uma revisão sistemática-metanálise da prevalência dos agentes causadores da TPB, concluiu que o Nordeste, seguindo a classificação de Mahoney e Ross (1972), é a região do Brasil mais instável enzooticamente, apresentando as taxas de prevalência 39,2% para *Babesia* spp. e de 32,8% para *Anaplasma marginale*. Foram relacionados aos dados obtidos, os longos períodos de estiagem, as altas temperaturas e a presença de áreas mais úmidas propícias para o desenvolvimento dos vetores, como a Zona da Mata. Entretanto, é necessária cautela quanto a essa condição epidemiológica, pois a ausência de padronização dos desenhos experimentais, das populações estudadas e dos métodos diagnósticos utilizados, influencia diretamente na alta heterogeneidade das informações de prevalência, características que podem ser observadas nos dados referentes a ocorrência da tristeza parasitária bovina no país (MIGLIAVACA et al, 2020).

2.1.2 Transmissão e ciclo biológico

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o único vetor biológico de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, dessa forma, a transmissão desses agentes é exclusivamente vetorial, diferente do que é observado na transmissão da anaplasmoose bovina (MADRUGA et al., 2000; MACHADO NETO; FREITAS; MILAGRES, 2021). O ciclo de vida desses protozoários engloba um animal vertebrado como hospedeiro intermediário (exemplo: bovinos), ocorrendo a propagação assexuada por esquizogonia e/ou merogonia, e o vetor (carrapato) como

hospedeiro definitivo, onde ocorre a reprodução sexuada por gametogonia e propagação assexuada por esporogonia (SCHNITTGER et al., 2012).

O carrapato vetor (em fase de larva ou ninfa), é infectado por *B. bigemina* e *B. bovis* durante o repasto sanguíneo após a ingestão dos glóbulos vermelhos infectados, caracterizando a transmissão transestadial. Além disso, nas pastagens, através da transmissão transovarial, as fêmeas realizam a ovoposição e também transmitem à sua descendência os protozoários com os quais se infectou (FLORIN-CHRISTENSEN, 2009; RIBEIRO et al., 2017). A transmissão desses agentes ocorre através de fases de vida diferentes do vetor. *B. bovis* é transmitida ao bovino pelas larvas de *R. microplus*, sem permanecer no carrapato como um agente infeccioso, enquanto *B. bigemina* é transmitida pelos estágios de ninfa e adultos de *R. microplus* (MENDES, 2019).

Em suas formas infectantes (esporozoítos), ao adentrarem na circulação sanguínea *B. bigemina* e *B. bovis*, passam pela fase de merogonia, caracterizada pela transformação de esporozoítos em trofozoítos. Cada trofozoíto, por reprodução assexuada, dá origem à duas formas piriformes e unidas pela extremidade afilada, essas estruturas são chamadas de merozoítos. A multiplicação assexuada dos merozoítos dentro dos eritrócitos resulta na hemólise das células, liberando merozoítos para o plasma sanguíneo que irão parasitar novas hemácias (SCHNITTGER et al., 2022; SERRAS, 2017).

2.1.3 Patogenia e sinais clínicos

O período de incubação da babesiose varia em torno de sete a vinte dias. *B. bovis* apresenta tropismo pela circulação de órgãos (vasos capilares) como fígado, baço, os rins, cérebro, cerebelo e meninges, com pouco tropismo pela circulação periférica (ANDRADE JÚNIOR, 2021).

Todos os agentes etiológicos envolvidos na tristeza parasitária bovina, realizam parasitismo obrigatório nos eritrócitos, dessa forma, as sintomatologias são similares em decorrência da destruição dessas células (SANTOS et al, 2019). Na fase aguda da doença, podem ser observados os seguintes sinais clínicos: apatia, anorexia, febre (40 a 41,5°C), anemia, icterícia, hemoglobinemia, calafrios, taquicardia, mialgias, dispneia, diminuição na produção de leite, redução dos movimentos ruminais, mucosa pálida, fadiga, aborto, incoordenação motora, taquipnéia e ranger dos dentes (TRINDADE et al., 2011; SANTAROSA et al., 2013; RICARDI, 2021).

Babesia bovis pode desencadear sinais neurológicos (babesiose cerebral), resultado do sequestro de eritrócitos nos capilares do cérebro ao induzir a aderência de uns aos outros e à parede vascular de capilares sanguíneos, dessa forma, por serem sintomas inespecíficos, os sintomas neurológicos devem ser bem avaliados, eliminando a possibilidade da existência de outras doenças no sistema nervoso central (SILVA et al., 2018).

2.1.4 Diagnóstico

A síndrome clínica causada pela tristeza parasitária bovina (TPB), de forma geral, apresenta sintomatologia expressiva, facilitando a triagem clínica de possíveis animais acometidos pela doença. Entretanto, os aspectos clínicos apresentados pelo animal não devem ser utilizados como única ferramenta para o diagnóstico, levando em consideração que os sinais clínicos são muito semelhantes aos apresentados em outras doenças que frequentemente acometem os rebanhos bovinos (VANAZZI et al., 2018; DIERINGS e WILMSEN, 2021).

A atual imprecisão no diagnóstico das doenças do complexo TPB impacta a bovinocultura brasileira em diversos aspectos, como na dificuldade do estabelecimento de áreas livres, na genética dos rebanhos e aumentando a morbidade e mortalidade dos animais (ANDREOTTI; GARCIA; KOLLER, 2019). O diagnóstico laboratorial consiste na identificação dos agentes através de métodos diretos como o esfregaço sanguíneo, por métodos indiretos como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) ou através da biologia molecular utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (SANTOS et al., 2017; ALMEIDA et al., 2019).

A utilização do esfregaço sanguíneo para visualização direta dos agentes nos eritrócitos infectados é o método mais antigo utilizado para o diagnóstico, principalmente na fase aguda da doença quando a parasitemia é alta, sendo utilizado sangue periférico, indicando-se a preferência pela coleta em ponta de orelha. Apesar de ser relatado como padrão ouro, esse método não permite um diagnóstico seguro em animais com baixa parasitemia, como nos casos crônicos ou na infecção por *B. bovis* que na fase aguda demonstra baixa quantidade de estruturas piriformes visualizadas (VIEIRA, 2021; SILVA et al., 2022).

As técnicas RIFI e de ELISA, são bastante utilizadas para diagnóstico da TPB no Brasil, indicando a exposição ao agente através da identificação dos níveis de anticorpos, entretanto, não permitem identificar a fase de infecção (SOLANO-GALLEGO et al., 2016). A RIFI possui uma limitação, que é o número de amostras realizadas por dia, sendo o mais

utilizado para o diagnóstico da babesiose, em contrapartida, o teste de ELISA permite trabalhar com muitas amostras por dia. Apesar de suas limitações, os métodos sorológicos são de extrema importância ao contribuírem com a caracterização epidemiológica das regiões, avaliando as falhas nas medidas de controle como premunicação, vacinação e controle de carrapatos dos rebanhos e possibilitando a realização de alterações nessas condutas (MONTEIRO et al., 2017; AFONSO, 2019).

As técnicas moleculares, como a PCR, atuam detectando o DNA dos agentes e têm sido aplicadas para o diagnóstico de tristeza parasitária bovina, em decorrência de sua alta sensibilidade e especificidade. Possibilitam a identificação de animais assintomáticos crônicos no rebanho (atuam como fonte de manutenção da doença), a distinção de animais soropositivos infectados de animais vacinados, o diagnóstico de animais recém-parasitados e a presença dos agentes nos vetores (PARODI, 2019; SILVA et al., 2021). Além disso, é possível distinguir diversas espécies através da PCR, útil em complexos parasitários como a TPB, otimizando o diagnóstico (TAYYUB et al., 2019).

2.2 Perfil bioquímico sérico

O perfil bioquímico sérico é capaz de refletir o estado funcional e estrutural das células, sendo utilizado como um indicador e avaliador dos processos adaptativos do organismo aos desafios nutricionais, fisiológicos e desequilíbrios metabólicos, refletindo o quadro clínico não somente dos indivíduos, mas também do rebanho. Além de atuar como uma ferramenta de auxílio diagnóstico, os testes bioquímicos permitem a avaliação da progressão das doenças, especialmente nos sistemas hepático e renal, possibilitando o estabelecimento de um prognóstico correto (MUNDIM et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2012; SOUZA et al., 2020).

A base para a correta interpretação das informações obtidas através da análise do perfil bioquímico consiste nos conhecimentos referentes a cada teste laboratorial e do reconhecimento dos efeitos das doenças nos processos fisiológicos, no entanto, fatores como raça, idade, estresse, dieta, manejo, clima e estado fisiológico controlam as concentrações sanguíneas dos vários metabolitos, dessa forma, interferindo também nos resultados obtidos e suas interpretações (MOHRI; SHARIFI; EIDI, 2007; VACCARI, 2019).

A presença de interferentes laboratoriais como a hemólise, lipemia e icterícia nas amostras destinadas para análise, também podem direcionar o médico veterinário para diagnósticos equivocados e a realização do protocolo terapêutico inadequado. A presença

dessas alterações, em sua maioria, é atribuída aos erros pré-analíticos como falhas na preparação do paciente, coleta inadequada e armazenamento incorreto (RODRIGUES et al., 2022; TISCHLER, 2021).

Dentre os interferentes laboratoriais endógenos citados, a hemólise é reconhecida com maior frequência, sendo resultado da ruptura dos eritrócitos e extravasamento do seu conteúdo intracelular, incluindo a hemoglobina, que confere ao soro após centrifugação a coloração avermelhada (MARTINS et al., 2021). Os agentes causadores da tristeza parasitária bovina desencadeiam um quadro de anemia hemolítica ao infectarem os eritrócitos, sendo observada a hemólise, principalmente em altos níveis de parasitemia (SILVA; PORTO; GERARDI, 2017; SILVA et al., 2019).

A maioria dos laboratórios veterinários realizam a classificação quanto ao grau de hemólise apenas de forma visual, todavia, a mensuração de forma manual (método colorimétrico da cianometemoglobina modificado) ou por automação através da quantificação da hemoglobina torna-se o método mais sensível e confiável, não sendo exposta a variação individual de cada profissional (SANTOS; VEIGA; GOETTEN, 2017).

Agindo como catalisadores nas reações bioquímicas, nas regulações hormonais endócrinas, como nutrientes, na defesa do organismo por meio dos anticorpos, a proteína é o componente mais abundante no plasma (KANEKO et al., 2008). As principais proteínas plasmáticas são: albuminas e fibrinogênio (produzidas pelo fígado) e as globulinas (produzidas pela ação humoral dos linfócitos), a síntese dessas moléculas está correlacionada com o estado funcional desse órgão, com o aporte nutricional ofertado ao animal e com sistema imunológico do animal (PODESTÁ JÚNIOR, 2017).

O valor obtido na análise das proteínas totais reflete a concentração de albumina e globulina no plasma. Alterações nessas concentrações ocorrem como reflexo de processos fisiológicos inespecíficos ou de condições patológicas como disfunções hepáticas, falhas renais e intestinais, parasitismos e hemorragias que atuam diminuindo esses valores ou aumentando nas infecções microbianas, lesões teciduais, reações imunológicas e processos inflamatórios em decorrência da produção de proteínas de fase aguda (FRIOLANI, 2017; REZENDE, 2017; SOUZA et al., 2019).

A albumina recebe destaque entre as proteínas presentes no plasma, pois 50% da massa proteica total é composto por este analito. Uma de suas principais funções é a manutenção da pressão osmótica do plasma sanguíneo (colaborando com 80%). Essa molécula participa do transporte de substâncias com solubilidade reduzida em meios aquosos, como os ácidos graxos,

bilirrubina, colesterol, metais e aminoácidos, além disso apresenta potencial antioxidante e é de extrema importância para o transporte de variadas substâncias farmacológicas (FREITAS et al., 2018; GATTA; VERARDO; BOLOGNESI, 2012).

Contreras (2018) relata que doenças infecciosas, sejam elas de origem viral, bacteriana, helmíntica ou protozoária, têm a capacidade de desencadear a diminuição da concentração de albumina (proteína de fase aguda negativa), além de se apresentar diminuída em afecções como casos crônicos de insuficiência hepática, problemas relacionados a absorção de proteínas no intestino e obesidade. A diminuição considerável da concentração de albumina representa um fator de risco, sendo associada a prognósticos ruins (CONNER, 2017). Caracterizada como uma proteína negativa para fase aguda, quadros de hiperalbuminemia estão associados em sua maioria a desidratação, todavia, seu aumento transitório pode ocorrer durante a administração de glicocorticoides (CDMA, 2018; SILVA, 2022).

A creatinina é um metabólito produzido em decorrência da degradação da creatina presente no tecido muscular, principal fonte fosforilada de ATP nesse tecido. Sendo assim, a concentração de creatinina no plasma está diretamente relacionada a porcentagem de massa muscular do animal (PEREIRA, 2015). Sintetizada no fígado, a ureia é derivada da amônia reciclada no rúmen, obtida a partir da quebra de aminoácidos, tendo sua concentração no organismo diretamente ligada com os níveis de proteína na dieta (GONZÁLEZ; SCHEFFER, 2018). Ambas moléculas apresentam suas concentrações afetadas por fatores pré-renais, renais e pós-renais, são livremente filtradas pelos glomérulos renais e suas determinações sanguíneas auxiliam no diagnóstico de alterações no metabolismo das proteínas e no sistema renal do paciente (SILVA, 2015; WITTEWER, 2018).

Triglicerídeos, colesterol e fosfolipídios compõem o grupo de lipídeos presentes no plasma. Essas moléculas estão presentes nas membranas celulares, são utilizadas com fontes de energia e agem com co-fatores de enzimas e precursores de hormônios. Os triglicerídeos possuem relação direta com as proteínas, formam complexos com essas moléculas para que seja possível o seu transporte. São as principais formas de armazenamento dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), nos quais são esterificados em glicerol-3-fosfato (PISANI et al., 2017). Os principais órgãos envolvidos na produção de triglicerídeos são o fígado, glândula mamária, tecido adiposo e intestino delgado (AIRES, 2012). O colesterol se apresenta no organismo de forma livre ou esterificados com ácidos graxos, representando 30% do total de lipídeos no plasma. Sua origem endógena provém do acetil-CoA sendo sintetizado no fígado,

nas gônadas, no intestino, na glândula adrenal e na pele (SCOTT e STOCKHAM, 2012; FREITAS et al., 2018).

O cálcio e fósforo são minerais envolvidos na composição estrutural dos tecidos corporais, como eletrólitos mantendo o equilíbrio acidobásico, a pressão osmótica, a permeabilidade das membranas celulares e a transmissão de impulsos nervosos. O cálcio (Ca) está presente na matriz óssea e nos dentes, na forma de fosfato de cálcio, a deficiência primária de Ca, no Brasil, apresenta baixa casuística em bovinos a pasto uma vez que a maioria das plantas contém níveis suficientes de Ca. São observados casos de eficiência secundária ao excesso de fósforo em bovinos que recebem alimentação abundante em concentrados (JACKSON et al., 2006; MENDONÇA et al., 2011; RASBY et al., 2011). O fósforo é encontrado predominantemente na matriz mineralizada do osso como fosfato de cálcio, sendo no trato gastrointestinal sua segunda maior reserva. Esse mineral atua como o principal ânion intracelular, colabora com diversos processos metabólicos como crescimento e diferenciação celular, na formação de fosfolipídios, ácidos nucleicos e fosfoproteínas (PERÉZ et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Determinar a influência do grau de hemólise nos parâmetros bioquímicos, além da ocorrência de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em vacas leiteiras do sertão central do Ceará.

3.2 Objetivos Específicos:

3.2.1 Analisar o perfil bioquímico sérico de vacas leiteiras do sertão central do Ceará;

3.2.2 Avaliar a interferência da presença de hemólise nos resultados do perfil bioquímico sérico;

3.2.3 Determinar a ocorrência de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em propriedades inseridas na produção pecuária de leite do Ceará;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área do estudo

O estudo foi conduzido na microrregião do Sertão Central Cearense, mais precisamente no município de Quixeramobim, que se localiza entre a latitude: - 5.19812, longitude: - 39.29625° 11' 53" Sul, 39° 17' 46" Oeste, ocupando uma área física total de 3.276 km². Segundo dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), o clima da região é semiárido, as chuvas concentradas de fevereiro a maio com índice pluviométrico de 713 milímetros (mm) anuais e foram registradas temperaturas entre 13,7 °C e 39,6 °C desde 1994. A vegetação presente em praticamente todo município é a caatinga arbustiva densa ou aberta. Os procedimentos relacionados à manipulação animal foram realizados de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e com a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, conforme parecer 24/2021. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Diagnósticos em Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (PCVET-UFERSA). A extração de DNA e PCR foram realizadas no Laboratório de Morfofisiofarmacologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS – Biomédicas I) da UFERSA.

4.2 Coletas e processamento das amostras

Foram coletadas 187 amostras de sangue total por punção venosa em vacas leiteiras, selecionadas aleatoriamente, de 15 fazendas distintas e em diferentes sistemas de produção (extensivo, semi-extensivo, semi-intensivo e intensivo). De cada animal, foram colhidos 13 ml de sangue divididos entre tubos estéreis contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e tubos sem a presença de anticoagulantes para obtenção de soro. Os tubos foram acondicionados em caixas isotérmicas e destinados ao Laboratório de Diagnósticos em Patologia Clínica Veterinária (PCVET-UFERSA). No laboratório, as amostras contendo EDTA precisaram ser congeladas para posterior análise molecular e aquelas destinadas à análise do perfil bioquímico sérico foram centrifugadas por 5 minutos, a 2500 rpm, para retração do coágulo. Ato contínuo, o soro sanguíneo obtido foi acondicionado em microtubos de 1,5 ml e congeladas até o momento das análises.

4.3 Mensuração dos parâmetros bioquímicos

Foram mensuradas de todas as amostras coletadas as concentrações séricas e seus respectivos métodos: proteínas totais (colorimétrico), albumina (verde de bromocresol), creatinina (cinético colorimétrico), ureia (cinético de tempo fixo), triglicerídeos (enzimático colorimétrico), colesterol (fotométrico enzimático), cálcio (colorimétrico de ponto final – arsenazo III) e fósforo (colorimétrico). Foi utilizado um conjunto de reagentes específicos de acordo com cada método e o aparelho analisador bioquímico semiautomático modelo BIO-200.

Foi observada a presença de hemólise em parte das amostras obtidas. As amostras com alteração na coloração foram separadas, classificadas visualmente em dois graus de hemólise (leve e acentuado como exposto na figura 1) e a concentração de hemoglobina sérica foi mensurada (método cianometemoglobina), além dos analitos anteriormente citados.

Figura 1. Classificação visual do grau de hemólise presente no soro de vacas leiteiras no Laboratório de Diagnósticos em Patologia Clínica Veterinária, UFERSA, 2022. Microtubos com alíquotas de soro bovino; G0: amostra sem a presença de hemólise; G1: amostra com grau leve de hemólise; G2: amostra com grau acentuado de hemólise.

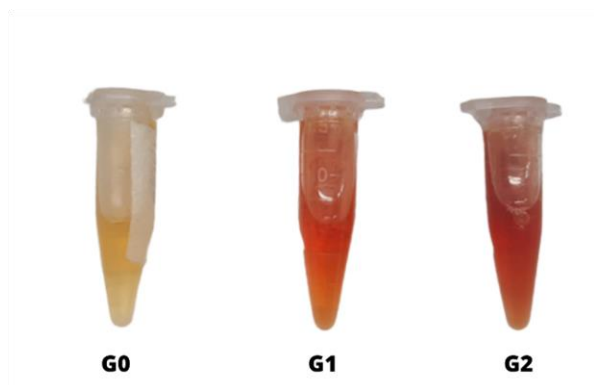


Imagem: arquivo pessoal.

4.4 Extração de DNA e PCR

Para realização da extração de DNA e PCR, foram selecionadas aleatoriamente 4 amostras de cada fazenda pertencente ao estudo, totalizando 60 amostras utilizadas. A extração de DNA das amostras sanguíneas foi realizada utilizando o kit comercial MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Thermo Fisher Scientific), conforme recomendações do fabricante. Após a extração o material genômico foi quantificado em espectrofotômetro

(NanoDrop™ Lite, Thermo Scientific) e as amostras armazenadas a -20 °C até o momento da PCR.

Para detecção do DNA de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) validados em trabalhos previamente publicados (Tabela 1). As PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de Hot Start Taq Pol Master Mix (2X) (Cellco®), 1 µL de cada primer (10 mM), 9,5 µL de água DEPC e 1 µL de amostra. A amplificação de DNA de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* foi realizada por PCR convencional. Para todas as reações, foram utilizados como controle positivo DNA de amostras sabidamente positivas para os agentes pesquisados gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Francisco Assis Leite Souza (Universidade Federal Rural de Pernambuco) e, como controle negativo, água DEPC.

Tabela 1. Sequência de iniciadores utilizados na PCR para detecção de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, com seus respectivos genes-alvo, programa de amplificação, tamanho do produtos e referência

Gene alvo	primer	Sequência (5' → 3')	Programa de amplificação	Produto (pb)	Referência
<i>B. bigemina</i> (SS rRNA)	GAU6 – R GAU7 - F	CCACGCTTGAAGCACAGGA GTTGGGTCTTTTCGCTGGC	Desnat. ¹ inicial 94°C, 2' 40 ciclos de: Desnaturação: 94°C, 30' Anelamento: 61.1°C, 30'' Extensão: 72°C, 1' Extensão final: 72°C, 5'	685	Linhares et al. (2002)
<i>B.bovis</i> (SS rRNA)	GAU9 - F GAU10 -R	CTGTCGTACCGTTGGTTGAC CGCACGGACGGAGACCGA	Desnat. ¹ inicial 94°C, 2' 40 ciclos de: Desnaturação: 94°C, 30' Anelamento: 62°C, 30'' Extensão: 72°C, 1' Extensão final: 72°C, 5'	541	Linhares et al. (2002)

Os produtos amplificados à PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, utilizando o Brometo de etídio como corante evidenciador de DNA por 45 minutos a 120 volts. Para determinação do tamanho dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig®) seguindo

recomendações do fabricante. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em transiluminador de luz UV (Proteinsimple®) para determinação do tamanho do produto amplificado.

As amostras foram consideradas positivas para a detecção do gene SS rRNA de *Babesia bigemina* e gene SS rRNA *Babesia bovis* ao se detectar produtos amplificados com tamanho aproximado de 685 pb (LINHARES et al., 2002) e 541 pb (LINHARES et al., 2002), respectivamente.

4.5 Análise estatística

Para as análises estatísticas dos resultados da análise do perfil bioquímico sérico foi utilizado o pacote estatístico do SAS (9.3). Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk ao nível de 5% de probabilidade para verificar a normalidade dos dados. Os dados com distribuição normal foram comparados pelo teste Tukey quando a comparação foi entre todos os graus de hemólise e o teste F da análise de variância para comparação entre os graus leve e acentuada. Os dados que não apresentaram distribuição normal, foram normalizados pelo procedimento PROC RANK do pacote estatístico do SAS (9.3) e os dados não normalizados foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis ao nível de 5% de probabilidade. Na análise estatística dos resultados das análises moleculares, a frequência de infecção por *B. bigemina* e *B. bovis* foi disposta em tabelas de distribuição de frequência simples.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros bioquímicos e a interferência da hemólise

No total, 187 amostras de soro bovino foram analisadas, sendo subdivididas de acordo com o grau de hemólise visual e mensuração da hemoglobina sérica. Os graus estabelecidos foram: grau 0 (sem a presença de hemólise), grau 1 (hemólise leve) e grau 2 (hemólise acentuada). A coorte consistiu em 111 animais classificados como grau 0, 54 animais classificados como grau 1 e 22 animais classificados como grau 2. Os valores médios, coeficientes de variação e o valor-p (significância) das concentrações de analitos séricos de vacas leiteiras do sertão central do Ceará estão descritos na tabela 2 abaixo.

Tabela 2 - Valores médios, coeficientes de variação e o valor-p (significância) das concentrações séricas dos analitos nas amostras classificadas de acordo com grau de hemólise.

	Média (G0)	Média (G1)	Média (G2)	CV%	Valor-p
Hemoglobina (g/dL)	0,00 ^a	0.34 ^b	0.63 ^c	155,90	<.0001
Proteínas totais (g/dL)	6,00	5.93	6.10	18,31	0,815
Albumina (g/dL)	3,06	2.98	3.09	15,91	0,628
Ureia (mg/dL)	28,71	27.78	24.53	44,95	0,351
Creatinina (mg/dL)	1,61	1.57	1.58	30,73	0,895
Triglicerídeos (mg/dL)	17,62 ^b	18.05 ^{ab}	25.22 ^a	74,75	0,034
Colesterol (mg/dL)	137,47 ^b	173.56 ^a	167.61 ^a	39,36	0,001
Cálcio (mg/dL)	12,34	11.73	12.13	33,18	0,635
Fósforo (mg/dL)	9,01	8.79	8.09	32,25	0,637

No presente estudo, a significância foi estabelecida em $P= 0,05$ e as amostras agrupadas a partir da classificação visual apresentaram diferenças significantes e gradativas em suas concentrações de acordo com a coloração (G0= 0,00 g/dL de Hb; G1= 0,34 g/dL de Hb; G2= 0.63 g/dL de Hb), inferindo que o método visual pode ser utilizado como forma de triagem, mas que não descarta a necessidade da mensuração da hemoglobina sérica como afirma Larrán et al. (2022).

Os valores dos analitos albumina, ureia, creatinina e cálcio permaneceram dentro do intervalo de referência estabelecido para cada analito e para a espécie bovina, não havendo alterações significantes. A presença da hemólise exerceu efeito sobre as concentrações dos

seguintes parâmetros bioquímicos avaliados: proteínas totais, fósforo, triglicerídeos e colesterol. Verificou-se discreta diminuição nas concentrações séricas de proteínas totais nas amostras com hemólise leve (G2), estando de acordo com o observado por Cincovic et al. (2016).

As variáveis albumina e ureia apresentaram resultados diferentes do relatado por Almeida et al. (2011) em bovinos e por Moraes et al. (2018) em cães, que observaram o aumento significativo desses parâmetros, entretanto, de acordo com os autores a interferência de erros pré-analíticos como a hemólise na análise da albumina pode ser influenciada pelo método analítico utilizado.

Em comparação ao soro, nas hemácias as concentrações de creatinina são superiores, sendo liberada no momento da ruptura dessas células, porém, as concentrações de creatinina não sofreram influência da hemólise em nenhum dos grupos estabelecidos neste estudo, corroborando com os resultados obtidos por Scaramele et al. (2017) na medicina humana e Freitas et al. (2018) em cães.

As concentrações de cálcio não foram influenciadas pela hemólise em nenhuma das concentrações de hemoglobina. Larrán et al. (2021) analisou a influência da hemólise no perfil mineral do soro bovino, constatando valores elevados de cálcio apenas na presença de altos níveis de hemoglobina no soro, estabelecendo limiar de 800 mg/dL para que sejam observadas alterações.

Mirghaed (2017) também avaliou a interferência da hemólise no perfil bioquímico, porém, utilizou o plasma de peixes, observando o aumento nas concentrações de fósforo e uma relação proporcional de acordo com a porcentagem de sangue adicionado ao plasma, compatível com o observado no presente estudo, entretanto, não houve diferenças significativas entre os grupos G0, G1 e G2 para esse analito.

Foi possível observar o aumento dos valores de triglicerídeos e colesterol das amostras analisadas. Para os triglicerídeos, houve diferença significativa entre os valores de amostras não hemolisadas (G0) e amostras com hemólise acentuada (G2). Quanto ao colesterol, também foi observado o aumento das concentrações, entretanto, não houve diferenças significativas entre os níveis leve e acentuada de hemólise, apenas entre amostras não hemolisadas (G0) e amostras com hemólise (G1 e G2). Os resultados obtidos divergem dos descritos por Cincovic et al. (2016) que relata a diminuição significativa desses constituintes séricos.

Stokol e Nydam (2006) avaliaram o efeito da hemólise nas concentrações de ácidos graxos não esterificados e b-hidroxibutirato no sangue bovino, constatando o aumento

dramático dos valores de triglicerídeos, o que condiz com o observado neste estudo. Almeida et al. (2011) também observou o aumento no colesterol em amostras de soro bovino hemolisadas. O aumento nos valores do colesterol pode estar relacionado com a liberação de colesterol da membrana eritrocitária ou com fatores relacionados ao equipamento utilizado ou o uso do branco (OLIVEIRA, 2014; O'NEILL e FELDMAN, 1989).

Para a realização das análises do perfil bioquímico sérico, foram utilizados kits de reagentes dos fabricantes Bioclin®, Vida Biotecnologia® e Kovalent®, que estabelecem na bula dos seus produtos concentrações de hemoglobina livre no soro capazes de interferir na avaliação dos parâmetros. Os valores fornecidos para cada analito são: proteínas totais (0,0018 g/dL), albumina (0,1 g/dL), ureia (0,3 g/dL), creatinina (0,18 g/dL), cálcio (não é recomendado o uso de amostras com hemólise), fósforo (hemólise leva a valores falsamente elevados), colesterol (0,2 g/dL) e triglicerídeos (0,5 g/dL). Apesar dos valores de interferência da hemoglobina livre apresentados para albumina, ureia e creatinina serem menores ou estejam semelhantes aos mensurados nos grupos G1 e G2 dessa pesquisa, não houve influência nas suas concentrações. Por outro lado, as informações fornecidas para proteínas totais, fósforo, colesterol e triglicerídeos corroboram com os dados encontrados nesse estudo.

São observados diversos trabalhos científicos referentes ao estudo do perfil bioquímico sérico de bovinos, correlacionados a fatores como a raça, nutrição, condições de infecção por parasitas e fases de vida (BATISSACO, 2018; MELO et al., 2018; OLIVEIRA, 2019; MENDES, 2019; PORTILLO, 2020; GEMELLI, 2020; UHRIG et al., 2020; BARBOSA et al., 2022;). No cenário nordestino, os trabalhos científicos seguem linhas de pesquisa semelhantes, apesar de serem constatados um número menor de estudos realizados (LEMONS, 2015; TOLENTINO et al., 2019; CONCEIÇÃO et al., 2019; SOUTO et al., 2019).

Apesar da grande disseminação do conceito e padronização da recusa de amostras com essa característica, atualmente na medicina veterinária, estudos relacionados a capacidade de interferência de alterações como a hemólise na análise do perfil bioquímico sérico são escassos e direcionados aos pequenos animais domésticos em sua maioria, sendo necessário extrapolar informações da medicina humana (STOKOL e NYDAM, 2006; ALMEIDA et al., 2011; CINCOVIC et al., 2016; MORAIS et al., 2018; LARRÁN et al., 2021; GUARINO et al., 2022; LARRÁN et al., 2022).

A comparação e correlação dos resultados obtidos é limitada em decorrência da escassez de estudos científicos disponíveis na medicina veterinária referentes ao tema para todas as espécies. As pesquisas já realizadas para avaliação da interferência da hemólise nas

análises do perfil bioquímico sérico utilizam a hemólise induzida *in vitro*, seja provocando-a de forma mecânica através da maceração com ponteira, adicionando sangue total ou hemolisado ao soro ou plasma (FREITAS et al., 2018; MIRGHAED, 2017), resultando em intervalos discrepantes de concentrações de hemoglobina avaliadas.

5.2 Detecção molecular de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*

Na PCR convencional realizada para detecção molecular de *B. bigemina*, as amostras foram consideradas positivas ao apresentarem um produto amplificado de aproximadamente 685pb, o que ocorreu em 15% (9/60) das vacas leiteiras (figura 2).

Figura 2 - Detecção do gene SS rRNA de *B. bigemina* por PCR convencional em vacas leiteiras do sertão central do Ceará, 2021/2022. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de etídio; L: marcador de peso molecular, 100pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo; 2, 7, 19, 22, 26, 28, 31, 34 e 35: amplificação de um fragmento de aproximadamente 685pb específico do gene SS rRNA de *B. bigemina*.

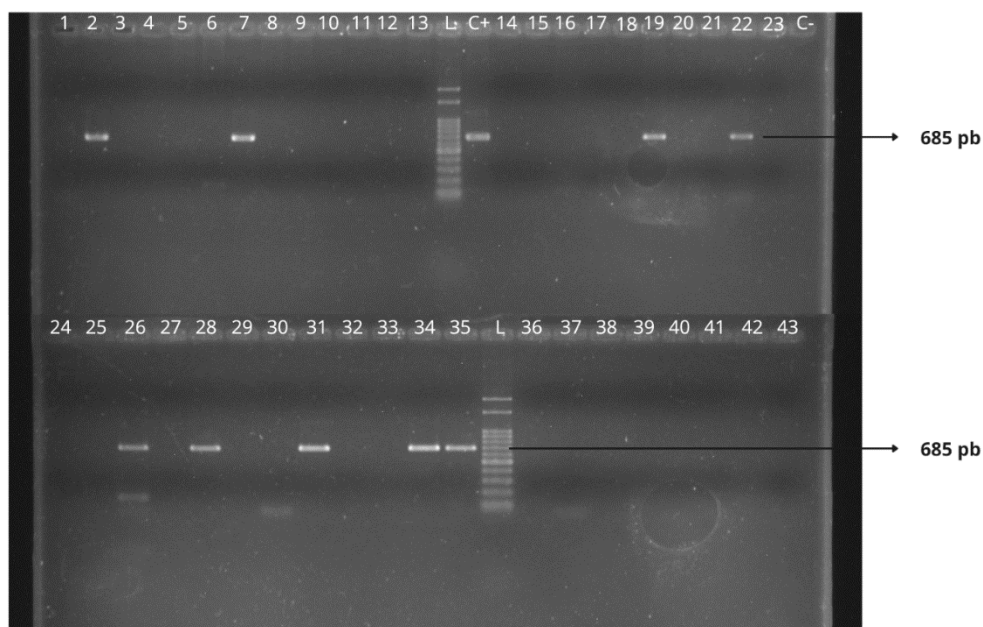


Imagem: arquivo pessoal.

O valor de prevalência obtido no estudo é equivalente ao exposto por Bahia et al. (2020) com bezerros utilizando *nested* PCR, em Minas Gerais/MG. Divergindo dos resultados, Amorim et al. (2014), avaliaram fêmeas adultas e bezerros, obtendo valores maiores de

prevalência (34%) do agente nos animais por meio da PCR em tempo real (qPCR). Oliveira et al. (2005) também por meio da *nested* PCR, detectaram um percentual de 38,2% de animais positivos para *B. bigemina* em bovinos de diversas raças, concluindo que não existe interferência dessa característica. Vespasiano et al (2016) avaliando fêmeas bovinas nas diferentes fases de criação, constataram uma maior susceptibilidade para *B. bigemina* em animais mais jovens.

Na PCR convencional realizada para detecção molecular de *B. bovis*, as amostras foram consideradas positivas ao apresentarem um produto amplificado de aproximadamente 541pb, o que ocorreu em 10% (6/60) das vacas leiteiras (figura 3). A coinfeção foi observada em apenas 5% (3/60) dos animais.

Figura 3 - Detecção do gene SS rRNA de *B. bovis* por PCR convencional em vacas leiteiras do sertão central do Ceará, 2021/2022. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de etídio; L: marcador de peso molecular, 100pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo; 20, 21, 22 e 24: amplificação de um fragmento de aproximadamente 541pb específico do gene SS rRNA de *B. bovis*.

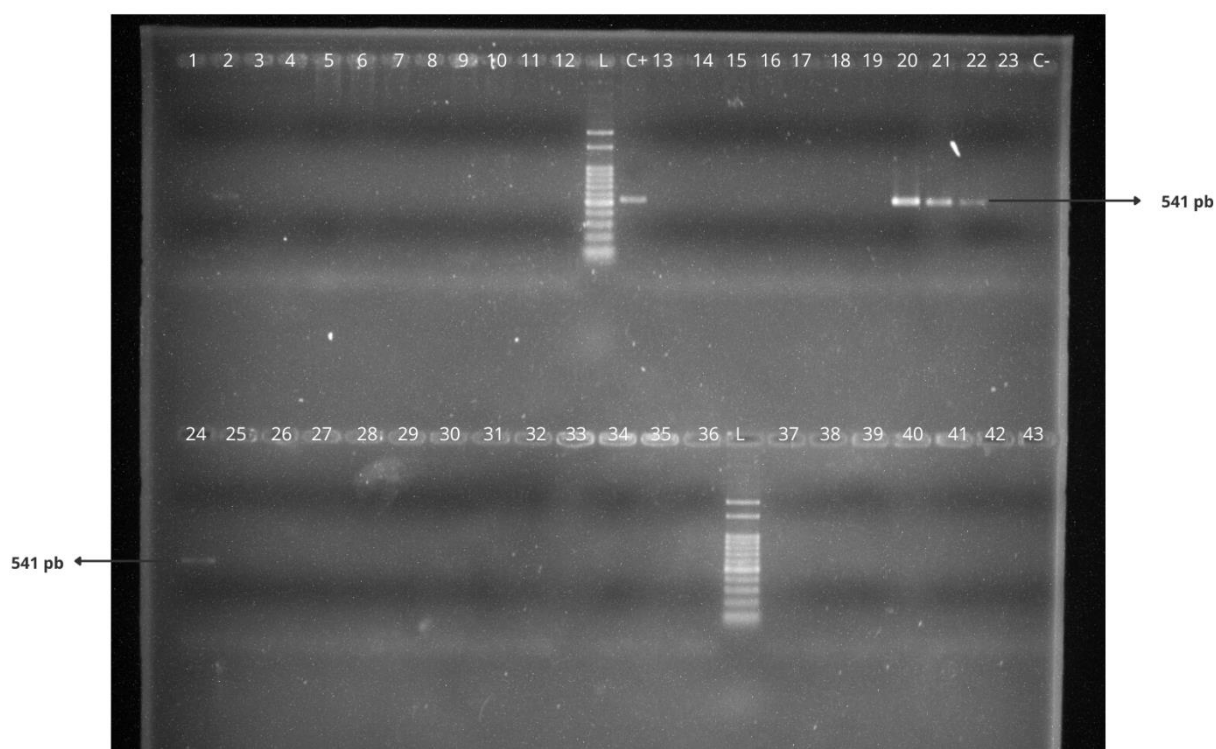


Imagem: arquivo pessoal.

Diferente do observado para *B. bigemina*, os dados de detecção molecular de *B. bovis* no presente estudo divergem de Bahia et al. (2020), que constatou apenas 4% dos animais infectados. Entretanto, em outros estudos utilizando PCR convencional foram obtidos resultados de prevalência superiores ao encontrado em vacas leiteiras de diversas fazendas do Ceará (SILVA; SANTOS; FONSECA, 2014; BRITO et al., 2019). Ferreira et al. (2019) estudando a prevalência de *B. bovis* em fêmeas gestantes bovinas, obteve um alto percentual (93,75%) de positivos para o agente, com todos os animais portadores assintomáticos. Também foi relatado um alto percentual (96,1%) de positividade para o agente em rebanhos mestiços leiteiros no estudo realizado por Brito; Barbieri; Oliveira (2019).

Em uma revisão sistemática-metanálise, Ferreira et al. (2022) avaliou a prevalência dos agentes causadores da tristeza parasitária no Brasil utilizando trabalhos científicos com diferentes métodos de diagnóstico (esfregaço sanguíneo, PCR, RIFI e ELISA), concluindo que no Brasil, dentre os trabalhos incluídos na pesquisa, 71,4% utilizaram como métodos de diagnóstico a PCR e esfregaço sanguíneo. Além disso, o método ELISA apresentou valores de prevalência maiores do que outros métodos, o que pode estar relacionado a detecção de anticorpos que não necessariamente representam uma infecção atual (SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

Em estados do Nordeste próximos ao Ceará, com Paraíba, Pernambuco e Piauí, os agentes causadores da TPB já foram relatados, utilizando como método diagnóstico a PCR convencional e o esfregaço sanguíneo (SOUZA et al., 2013; COSTA et al., 2011; SANTOS et al., 2017; COSTA et al., 2018; ANDRADE JÚNIOR, 2021). Essas regiões foram classificadas como áreas de instabilidade enzoótica em decorrência das características ambientais e dos valores percentuais de prevalência.

As divergências encontradas nos valores de ocorrência de *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* ao longo das regiões brasileiras entre outras literaturas e esse estudo, podem ser explicadas pelos diferentes contextos de pesquisa observados, como a faixa etária, a variação entre os tamanhos dos grupos de animais estudados e o método utilizado. Outro fator que deve ser levado em consideração, é a presença do vetor na região estudada, alguns estados brasileiros possuem condições propícias para a proliferação dos carrapatos ao longo de todo o ano, em outros o aumento da frequência desse vetor ocorre de acordo com as condições climáticas, sendo assim, o período do ano em que o estudo é realizado pode determinar um aumento ou diminuição dos valores de positividade para os agentes. Esses aspectos reforçam a necessidade do estabelecimento protocolos para que este tipo de estudo seja realizado no país.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, torna-se possível inferir que a presença da hemólise em amostras de soro bovino afeta as concentrações das proteínas totais, fósforo, triglicerídeos e colesterol na análise do perfil bioquímico, e que o grau de hemólise (concentração de hemoglobina) é um fator determinante nos dois últimos analitos citados. Tais informações foram capazes de reforçar a necessidade de estudos científicos referentes a influência da hemólise nas análises bioquímicas de bovinos e de outras espécies, escassos na medicina veterinária.

Os animais positivos para *B. bigemina* e *B. bovis* confirmam a presença de dois dos agentes causadores da tristeza parasitária bovina em rebanhos leiteiros do sertão central do Ceará, contribuindo para caracterização epidemiológica da doença no estado. Durante a revisão de literatura, não foram encontrados estudos de prevalência para a doença na região.

7 REFERÊNCIAS

AFONSO, M. C. C. **Prevalência de Babesia bovis, Babesia bigemina, Anaplasma marginale e Trypanossoma vivax em bezerros da região de Uberaba-MG.** 2019. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Uberaba, Uberaba, 2019.

AIRES, M. M et al. **Controle Hormonal e Neural do Metabolismo Energético.** IN: Fisiologia, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2012.

ALMEIDA, B. F. M. Efeito da hemólise sobre o perfil bioquímico sérico canino, bovino e equino. **Medicina Veterinária (UFRPE)**. Pernambuco, v. 5, n. 1, p. 12-17, 2011. Disponível em: <https://www.journals.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria/article/view/645>

ALMEIDA, L. S. et al. Comparação entre métodos de avaliação direta para o diagnóstico de babesiose em bovinos. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 8, n. 10, 23 ago. 2019. Research, Society and Development. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v8i10.1388>.

AMORIM, L. S. et al. Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. Bahia, v. 23, p. 328-336, 2014.

ANDRADE JÚNIOR, A. L. F. **Prevalência de hemoparasitas em bovinos na microrregião do brejo paraibano.** 2021. 39 f. TCC - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Paraíba. Paraíba, 2021.

ANDREOTTI, R. S.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos.** Brasília: Embrapa Gado de Corte, 2019. 240 p

BAHIA, M. et al. Characterization of cattle tick fever in calves from the northwestern region of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Minas Gerais, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612020011>

BARBOSA, F. C. et al. Influência da idade e sexo no perfil bioquímico sanguíneo de bovinos da raça Bonsmara até dois anos. **Ciência Animal Brasileira**, [S.L.], v. 23, 2022. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1809-6891v23e-73054p>.

BATISSACO, L. **Melatonina para o tratamento da degeneração testicular em touros e seus efeitos sobre a bioquímica sérica e do plasma seminal, termodinâmica e hemodinâmica testicular e características espermáticas.** 2018. 104 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Mapa do leite: Políticas públicas e privadas para o leite.** Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2021.

BRASIL. Orientação técnica nº 12, de 8 de Maio de 2018. Bem-estar Animal. **Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações**. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/anexo-da-orientacao-tecnica-no12-de-8-de-maio-de-2018.pdf/view>. Acesso em: 16 ago. 2022.

BRITO, L. G. et al. Babesia bovis infection in cattle in the southwestern Brazilian Amazon. **Ticks And Tick-Borne Diseases**, Amazônia, v. 4, n. 1-2, p. 78-82, fev. 2013. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.08.001>

BRITO, L. G. et al. Transmissão congênita de Babesia bovis e Anaplasma marginale na epidemiologia da tristeza parasitária bovina. **Embrapa Amazônia Oriental, Circular Técnica**, v. 48, 2019.

CENTRO DE DIAGNÓSTICO E MELHORAMENTO ANIMAL. **Manual de colheitas de amostras e exames em patologia clínicas e anatomopatologia**. Disponível em: <http://www.cdmalaboratorio.com.br/Manual-colheita-patologia-clinica-anatomopatologia-CDMA.pdf>. Acesso em: 15 out. 2018.

CINCOVIĆ, M. R. et al. Influence of Blood Sample Hemolysis on Hematological and Biochemical Parameters in Cows During Early Lactation. **Contemporary Agriculture**, v. 65, n. 3-4, p. 39-43, 2016.

CONÇEIÇÃO, W. L. F. et al. PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO DE VACAS DAS RAÇAS NELORE E GIROLANDO CRIADAS NO ESTADO DO MARANHÃO. **Ciência Animal Brasileira**, [S.L.], v. 20, 2019. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1089-6891v20e-33796>.

CONNER, B. J. Treating Hypoalbuminemia. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 47, n. 2, p. 451-459, 2017.

CONTRERAS, P. A. Indicadores do metabolismo proteico utilizados nos perfis metabólicos de rebanhos. In: GONZÁLEZ, F. H. D. (ed.). **Doze leituras em bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, v. 1, p. 83-88, 2018.

COSTA, M. O. et al. Os desafios do complexo da tristeza parasitária bovina – TPB. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 6, 10 jun. 2021. Research, Society and Development. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i6.16148>.

COSTA, V. M. M. et al. Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 239-243, 2011.

COSTA, V. M. M. et al. Incidência de Anaplasma marginale, Babesia bigemina e Babesia bovis em bezerros no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 605-612, 2018.

DAVID, G. **Estudo de Associação Genômica Ampla dos Níveis de Infestação por Rhipicephalus microplus e Infecção por Babesia bigemina e Babesia bovis em Bovinos da Raça Angus**. 2021.

DIERINGS, C. A.; WILMSEN, M. O. Tristeza Parasitária Bovina: Revisão Tick Borne Disease. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 56247-56263, 2021.

FERREIRA, G. C. M. et al. Prevalence of bovine Babesia spp., Anaplasma marginale, and their co-infections in Latin America: systematic review-meta-analysis. **Ticks and Tick-borne Diseases**, p. 101967, 2022.

FERREIRA, T. A. A. et al. **Diagnóstico molecular e taxas de infecção de Anaplasma marginale e Babesia bovis em rebanhos bovídeos e artrópodes parasitas na Amazônia**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019. Disponível em: <http://repositorio.ufra.edu.br/jspui/handle/123456789/883>. Acesso em 15 ago. 2022.

FLORIN-CHRISTENSEN, M. Piropasmids and ticks: a long-lasting intimate relationship. **Frontiers In Bioscience**, [S.L.], v. , n. 14, p. 3064, 2009. IMR Press. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2741/3435>.

FRANQUE, M. P. **Perfil da Pecuária Leiteira e Aspectos Epidemiológicos do Complexo Tristeza Parasitária Bovina na Mesorregião Sul Espírito-santense, ES**. 2010. 117 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

FREITAS, V. et al. Interferência da hemólise nas análises bioquímicas. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 10, n. 2, 2018.

FRIOLANI, M. **Utilização do perfil bioquímico-sérico, incluindo proteínas de fase aguda, como método auxiliar diagnóstico e prognóstico em fêmeas caninas acometidas por mucometra e piometra**. 2017. 109 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2017.

GANZINELLI, S. et al. Babesia in domestic ruminants. In: **Parasitic protozoa of farm animals and pets**. Springer, Cham, 2018. p. 215-239.

GASPAR, E. B. et al. **Medidas para Controle de Tristeza Parasitária Bovina**. 99. ed. Bagê: Embrapa Pecuária Sul, 11 p., 2018.

GATTA, A.; VERARDO, A.; BOLOGNESI, M. Hypoalbuminemia. Internal and Emergency Medicine, v.7, n. 3, p.193-199. 2012

GEMELLI, J. L. **Ação dos aditivos homeopáticos sobre o desempenho, saúde ruminal, hepática e qualidade de carne de bovinos Nelore terminados em confinamento.** 2020. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

GIGLIOTI, R. et al. qPCR estimates of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels in beef cattle and *Rhipicephalus microplus* larvae. **Experimental and Applied Acarology**, v. 75, n. 2, p. 235-240, 2018.

GONZALEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. L. F. S. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. **Simpósio de Patologia Clínica Veterinária (1.; 2003, Porto Alegre)**, 2003.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2019, n. 6, 2019. Disponível em: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2019/6/pdb.top095109.short> > Acesso em: 08 out. 2022.

GUARINO, A. L. et al. Comparison of biochemical and hematologic values obtained via jugular venipuncture and peripheral intravenous catheters in dogs. **Journal Of Veterinary Internal Medicine**, [S.L.], v. 36, n. 5, p. 1628-1640, 27 ago. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jvim.16518>.

GUEDES JUNIOR, D. S. et al. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 105-109, 2008.

HELLU, J. A. A.; REZENDE, Eduardo Henrique de Castro. **Tristeza parasitária bovina, como prevenir e tratar essa doença?** 2020. Disponível em: <https://www.jasaudeanimal.com.br/blog/tristeza-parasitaria-bovina-como-prevenir-e-tratar-essa-doenca>. Acesso em: 23 out. 2022.

JACKSON, R. D.; LACROIX, A.Z.; GASS, M. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. New England: **Journal of Medicine**, v.354,p.669–683,2006.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic 77 Animals*. 6th Editio ed. San Diego, California: **Elsevier Inc**, 2008. Disponível em: http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf%5Cnhttp://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=spsD4WQbL0QC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Clinical+Biochemistry+of+Domestic+Animals&ots=T_f6aJml8f&sig=sKSGfl8B1Rjre6_UTJHLMZSxbI%5Cnhttp://books.google.at/books

KEMER, A. **Manejo sanitário, resistência a carrapaticidas e prevalência dos agentes da tristeza parasitária bovina em propriedades brasileiras do planalto Serrano Catarinense,**

Sul do Brasil. 2020. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2020.

LAGRANHA, C. S. et al. PREVALÊNCIA DOS AGENTES DA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA NA FRONTEIRA OESTE DO RIO GRANDE DO SUL. **Anais do 9º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão da Unipampa :Salão de Pesquisa-Pôster**, Santana do Livramento, v. 9, n. 2, 2017.

LARRÁN, B. et al. Influence of Haemolysis on the Mineral Profile of Cattle Serum. **Animals**, v. 11, n. 12, p. 3336, 2021.

LARRÁN, B. et al. Measuring haemolysis in cattle serum by direct UV–VIS and RGB digital image-based methods. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2022.

LEMO, J. C. **Perfil bioquímico e status oxidativo em vacas leiteiras mestiças no período de transição em clima tropical.** 2015. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2015.

LEVINE, N. D. Taxonomia dos Piroplasmas. **Transactions Of The American Microscopical Society**. S. I, p. 2-33. jan. 1971. Disponível em: <https://doi.org/10.2307/3224894>

LINHARES, G. F. C. et al. Assessment of primers designed from the small ribosomal subunit RNA for specific discrimination between *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* by PCR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 27-32, 2002. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/288>. Acesso em: 16 ago. 2022.

LUIZ, L. C. et al. Uso da espectroscopia de infravermelho próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) para acompanhar o processo de Tristeza Parasitária Bovina / Use of near-infrared spectroscopy with Fourier Transform (FT-NIR) to accompany the Bovine Parasitic Sadness process. **Brazilian Journal Of Animal And Environmental Research**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 1594-1605, 5 abr. 2021. South Florida Publishing LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.34188/bjaerv4n2-003>.

MACHADO NETO, C. S.; FREITAS, A. P. G.; MILAGRES, D. C. R. Frequência de *Babesia* spp. em bezerras holandesas no município de Patos de Minas - MG / *Babesia* spp. occurrence in holstine calves in Patos de Minas - MG. **Brazilian Journal Of Animal And Environmental Research**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 5782-5791, 18 nov. 2021. South Florida Publishing LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.34188/bjaerv4n4-076>.

MADRUGA, C. R. et al. Avaliação preliminar de parâmetros epidemiológicos da tristeza parasitária bovina no rio grande do sul. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Campo Grande, v. 38, p. 1-7, 1987

MADRUGA, C. R. et al. Desenvolvimento de uma prova de imunoadsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Botucatu, v. 20, n. 4, p. 167-170, dez. 2000. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2000000400007>.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R.. EPIZOOTIOLOGICAL FACTORS IN THE CONTROL OF BOVINE BABESIOSIS. **Australian Veterinary Journal**, [S.L.], v. 48, n. 5, p. 292-298, maio 1972. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-0813.1972.tb05160.x>

MANICA, S. **Tristeza Parasitária Bovina**: revisão de literatura. 2013. 27 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

MARTINS, A. C. Á. et al. Avaliação dos Resultados de Amostras com Diferentes Graus de Hemólise em Dosagens de Colesterol / Evaluation of the Results of Samples With Different Degrees of Hemolysis in Cholesterol Assays. **Brazilian Journal Of Development**. v. 7, n. 8, p. 79734-79747, 12 ago. 2021. South Florida Publishing LLC. Disponível: <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n8-267>

MARTINS, K. R. et al. Seasonal fluctuations of *Babesia bigemina* and *Rhipicephalus microplus* in Brangus and Nellore cattle reared in the Cerrado biome, Brazil. **Parasites & Vectors**, Água Clara, v. 15, n. 1, p. 395-404, 28 out. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-022-05513-2>.

MARÇAL, W. S. TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA: UM DESAFIO TERAPÊUTICO. 2020. Disponível em: <https://labovet.com.br/wp-content/uploads/2020/09/TRISTEZA-PARASIT%C3%81RIA-BOVINA-ARTIGO-2020.pdf>

MELO, I. O. **Perfil laboratorial longitudinal de bezerros com anaplasmoses experimental**. 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

MENDES, H. C. P. M. **Perfil oxidativo e bioquímico de vacas da raça Gir leiteiro durante o período de parto**. 2019. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia, Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, 2019.

MENDES, R. E. et al. Estudo retrospectivo dos diagnósticos de tristeza parasitária bovina no Oeste Catarinense. **Boletim de Diagnóstico do Laboratório de Patologia Veterinária-IFC-Campus Concórdia**, v. 1, n. 1, 2016

MENDONÇA JÚNIOR, A. F. et al. Minerais: importância de uso na dieta de ruminantes. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.07, n 01, p.01–13. 2011.

MIGLIAVACA, C. B. et al. How are systematic reviews of prevalence conducted? A methodological study. **Bmc Medical Research Methodology**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 12-13, 26 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12874-020-00975-3>.

MIRGHAED, A. T. et al. Hemolysis interference in measuring fish plasma biochemical indicators. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 1143-1151, 2017.

MOHRI, M; SHARIFI, K.; EIDI, S. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: age related changes and comparison with blood composition in adults. **Research in veterinary science**, v. 83, n. 1, p. 30-39, 2007.

MONTEIRO S. G. (2017). Parasitologia na Medicina Veterinária. 370 p. 2. ed. – Rio de Janeiro: Roca.

MOLENTO, M. **Avaliação seletiva de bovinos para o controle do carrapato**. Brasília: Mapa, 2020. 140 p.

MORAIS, L. et al. Hemólise interfere na mensuração dos biomarcadores plasmáticos de estresse oxidativo em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 713-721, 2018.

MUNDIM, A.V. et al. Influência da ordem e estádios da lactação no perfil bioquímico sanguíneo de cabras da raça Saanen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Uberlândia, v. 59, n. 2, p. 306-312, abr. 2007. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-09352007000200006>.

OLIVEIRA, A. F. M. G. Correlations between the Osmotic Stability of the Erythrocyte Membrane and Hematological and Lipid Indices during Statin Therapy. 2014. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2014.302>

OLIVEIRA, M. C. S. DETECÇÃO MOLECULAR DE "BABESIA BIGEMINA" EM BOVINOS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS. **Embrapa Pecuária Sudeste**, Goiânia, 2005.

OLIVEIRA, M. G. C. et al. Aspectos hematológicos de caprinos (*Capra hircus*) da raça Canindé criados no Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio Grande do Norte, v. 32, n. 1, p. 04-08, dez. 2012. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2012001300002>

OLIVEIRA, R. M. **Variáveis hematológicas e bioquímicas séricas em borregas naturalmente infectadas por nematódeos gastrointestinais em sistema integrado de produção agropecuária**. 2019. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

O'NEILL, S. L.; FELDMAN, B. F. Hemólise como fator na química clínica e hematologia do cão. **Patologia Clínica Veterinária**, v. 18, n. 3, pág. 58-68, 1989.

PAIANO, R. B. et al. Haematological and biochemical profiles during the puerperium in dairy cows – Short communication. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 67, n. 3, p. 377-384, 2019. Acesso em: 08 out. 2022

PARODI, P. A. T. Abordaje multifactorial al diagnóstico de tristeza parasitaria bovina en el Uruguay [en línea] Tesis de maestría. Montevideo : Udelar. FV, 2019.

PAZINATO, R. et al. Influence of subclinical infection by agents of tick fever in milking dairy cows. **Revista MVZ Cordoba**, v. 21, n. 3, p. 5316-5327, 2016. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/journal/693/69350657003/html/>>. Acesso em: 08 out. 2022.

PEREIRA, P. V. R. **Perfil bioquímico sérico de Jabutis *Chelonoidis carbonaria* (Reptilia, Testudinidae) mantidos em cativeiro**. 2015. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

PERÉZ, F. I. V. **Cálcio, fósforo e magnésio no humor vítreo de bovinos no sul do Estado do Rio de Janeiro**. 2018. 51 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2018.

PISANI, R. B. F. **Avaliação dos níveis de colesterol e triglicerídeos em cães saudáveis submetidos a diferentes tempos de jejum**. 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2017.

PODESTÁ JUNIOR, R. L. **Padrões bioquímicos e hematológicos em bovinos mestiços conforme idade e sexo**. 2017. 92 f. Tese (Doutorado) - Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2017.

PORTILLO, M. L. A. Perfil bioquímico mineral en vacas cruzas de Cebú preñadas y vacias de un establecimiento de Caragatatay (Paraguay). **Compendio de Ciencias Veterinarias**, v. 10, n. 2, p. 5-11, 2020.

RASBY, R. et al. **Minerals and vitamins for beef cows**. University of Nebraska-Lincoln, Extension, 2011.

REZENDE, M. S. **Perfil bioquímico sanguíneo de linhagem pesada de frango de corte**. 2017. 61 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017

RIBEIRO, C. M. **Estudo morfológico, biológico e caracterização molecular de duas novas espécies de Trypanosoma oriundos de carrapatos naturalmente infectados**. 2017. 118 f.

Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Soropédica, 2017.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3 ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. v.1, e v. 2. 1466p.

RICARDI, E. L. **TRANSFUSÃO SANGUÍNEA A PARTIR DA ANÁLISE DE HEMATÓCRITO EM BOVINOS LEITEIROS ACOMETIDOS POR TRISTEZA PARASITÁRIA**. 2021. 32 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade do Centro do Paraná, Pitanga, 2021.

RODRIGUES, A. B. et al. Interferências pré-analíticas em exames laboratoriais: uma revisão narrativa. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 1-2, 28 jan. 2022. Research, Society and Development. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25839>.

ROMERO, A. R. S. **GENOMIC STUDIES OF Babesia bigemina AND Anaplasma marginale INFECTION LEVELS IN CATTLE**. 2021. 82 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2021.

SANTAROSA, B. P. et al. (2013). Infecção neurológica por Babesia bovis em bovino neonato: relato de caso. **Veterinária e Zootecnia**, 9–14.

SANTOS, G. B.; GOMES, I. M. M.; SILVEIRA, J. A. G. ET AL. Tristeza Parasitária em bovinos do semiárido pernambucano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 37(1):1-7, 2017.

SANTOS, L. R. et al. Tristeza Parasitária Bovina - Medidas de controle atuais. In: SILVA, Renato Andreotti e; GARCIA, Marcos Valério; KOLLER, Wilson Werner. **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Brasília: Embrapa Gado de Corte, 2019. Cap. 6. p. 87-97.

SANTOS, W. M.; VEIGA, A. M.; GOETTEN, A. L. F. A concentração de hemoglobina bovina é viável em sangue armazenado por até 14 dias. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 1, p. 76-79, 2017.

SCARAMELE, N. F. et al. Alterações de perfis bioquímicos induzidos pela hemólise in vitro em humanos: Revisão de literatura. **Revista do Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium-Araçatuba (São Paulo)**, p. 32, 2017.

SCHNITTGER, L. et al. Babesia: a world emerging. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 12, n. 8, p. 1788-1809, dez. 2012. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>.

SCHNITTGER, L. et al. The Piroplasmida Babesia, Cytauxzoon, and Theileria in farm and companion animals: Species compilation, molecular phylogeny, and evolutionary insights. **Parasitology Research**, p. 1-39, 2022.

SCOTT, M. A.; STOCKHAM, S. L. **FUNDAMENTOS DE PATOLOGIA CLINICA VETERINARIA**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 748 p.

SILVA, J. B.; SANTOS, P. N.; FONSECA, A. H. Molecular and serological detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in the Rio de Janeiro, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3139-3145, 2014.

SILVA, J. P. **Estenose lombossacral degenerativa em canino: relato de caso**. 2022. 28 f. Monografia - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, Realeza, 2022

SILVA, M. B. V. et al. Caracterização e importância da Tristeza Parasitária Bo-vina e estudo da variabilidade genética de *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) em bezerros da região noroeste de Minas gerais, Brasil. 2019.

SILVA, R. D. Avaliação Laboratorial do Sistema Hepatobiliar. In.: JERICÓ, M. M. e KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Roca, cap.122, p. 3139-3151, 2015.

SILVA, R. P. B. et al. Diagnóstico parasitológico da Tristeza Parasitária Bovina na Bahia – Estudo retrospectivo de 2017 a 2021. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 1-2, 25 jan. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25584>

SILVA, T. M. et al. Caracterização histoquímica no diagnóstico da babesiose bovina por *Babesia bovis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 38, n. 4, p. 649-658, abr. 2018. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5254>.

SILVA, T. F. et al. Tristeza parasitária bovina: Revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e15410111631-e15410111631, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/11631>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SILVA, T. J.; PORTO, B. S. C.; GERARDI, B. Principais causas de anemia hemolítica nos animais domésticos. *Revista Científica de Medicina Veterinária-Issn*, v. 1679, n. 7353, p. 353-364, 2017.

SERRAS, L. M. S. **Contribuição para o estudo dos hemoparasitas dos bovinos na Beira Interior**. 2017. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2017.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. A review of canine babesiosis: the European perspective. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-18, 2016.

SOUTO, R. J. C. et al. Biochemical, endocrine, and histopathological profile of liver and kidneys of sheep with pregnancy toxemia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 39, n. 10, p. 780-788, out. 2019. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-6400>.

SOUZA, A. F. et al. Proteinograma sérico de equinos da raça Campeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, p. 363-368, 2019.

SOUZA, D. S. et al. Perfil hematológico e bioquímico sérico de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre nos biomas Mata Atlântica e Caatinga. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p. 461-470, 2020.

SOUZA, F. A. L. et al. Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in Northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 33, n. 9, p. 1057-1061, set. 2013. FapUNIFESP (SciELO). Disponível: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2013000900002>.

STOKOL, T.; NYDAM, D. V. Effect of hemolysis on nonesterified fatty acid and β -hydroxybutyrate concentrations in bovine blood. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 18, n. 5, p. 466-469, 2006.

STOTZER, E. S. et al. Impacto econômico das doenças parasitárias na pecuária. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 3, p. 198-221, 2014. Disponível em: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal>. Acesso em: 12 ago. 2022.

TAYLOR, M A.; COOP, R L.; WALL, R L. **Parasitologia Veterinária**, 4ª edição. [Digite o Local da Editora]: Grupo GEN, 2017. E-book. ISBN 9788527732116. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527732116/>. Acesso em: 06 nov. 2022.

TAYYUB, M. et al. Genetic Diversity of Canine Babesia Species Prevalent in Pet Dogs of Punjab, Pakistan. *Animals*, v. 9, n. 7, p. 439, 2019.

TISCHLER, T. T. Erros laboratoriais da fase pré-analítica e suas interferências no laudo laboratorial: uma revisão de literatura. 2021. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021.

TOLENTINO, L. H. O. et al. **Perfil bioquímico sérico, eletrolítico e hematológico de bovinos nelore criados em regime extensivo no Estado do Piauí**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência e Saúde Animal) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2019. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/xmlui/handle/riufcg/25728> >. Acesso em: 12 ago. 2022.

TRINDADE, H. I. **Soroprevalência de tristeza parasitária em bezerros na região de Araguaína, Estado do Tocantins, Brasil**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, 2010.

TRINDADE, H. I., ALMEIDA, K. S., FREITAS, & F. L. C. Tristeza Parasitária Bovina – Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 16, 1-21, 2011.

VACCARI, J. **Avaliação clínica bucal de bezerros com doença periodontal e suas correlações bioquímicas séricas e salivares**. 2019. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2019..

VANAZZI, D. L. et al. Occurrence of Babesia bigemina and Anaplasma marginale in clinically affected cattle in western Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 21, 2020.

VESPASIANO, L.C. **Dinâmica da tristeza parasitária bovina em um sistema intensivo de produção de leite em Minas Gerais**. 2016. Dissertações de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – UFMG. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SMOC-ADEJXQ> Acesso em: 14 de novembro de 2019.

VIEIRA, L. F. **Ocorrência da Tristeza Parasitária Bovina em vacas leiteiras de uma propriedade do município de Olho d'Água do Casado (AL): Estratégias de prevenção e controle**. 2021. 62 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Sergipe, Nossa Senhora da Glória, 2021.

VILELA, D.; DE RESENDE, J. C. Cenário para a produção de leite no Brasil na próxima década. In: **Embrapa Gado de Leite-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 6.; SEMINÁRIO DOS CENTROS MESORREGIONAIS DE EXCELÊNCIA EM TECNOLOGIA DO LEITE, 2., 2014, Maringá. Perspectivas para a produção de leite no Brasil: anais. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2014.

UHRIG, L. et al. Perfil hematológico e bioquímico de bovinos da raça Aberdeen Angus da fazenda escola da ULBRA–Canoas/RS. **REVISTA VETERINÁRIA EM FOCO**, v. 17, n. 2, 2020.

WITTWER, F. Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: GONZÁLEZ, F. H. D. (ed.). **Doze leituras em bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018. v. 1, p. 58-69.