



ESTIMATIVA DE REPETIBILIDADE DOS NÍVEIS DE INFECÇÃO POR *ANAPLASMA MARGINALE* E CONTAGENS DE CARRAPATOS EM BEZERROS LEITEIROS CRIADOS EM SISTEMAS DE GAIOLAS INDIVIDUAIS

Cristiane Fernandes de Carvalho **Fiorin**¹; Marco Antônio Faria **Silva**²; Bianca Tainá **Azevedo**³; Rodrigo **Giglioti**³; Cecília José **Veríssimo**⁴

Nº 20701

RESUMO – O carrapato *Rhipicephalus microplus* é o vetor biológico da *Rickettsia A. marginale*, e ambos são considerados um dos principais parasitas que acometem a pecuária brasileira. Diferenças na suscetibilidade a esses parasitas tem sido verificada dentro das raças, sugerindo que pode ser possível selecionar um fenótipo mais resistente. Assim, o objetivo do presente estudo foi estimar as repetibilidades das contagens da infestação pelo carrapato *R. microplus* e do nível de infecção por *A. marginale* determinadas por meio da PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR) em 20 bezerros recém-nascidos da raça holandês criados em sistema de gaiolas individuais. Além da repetibilidade, as correlações entre as contagens de carrapatos e nível de infecção por *A. marginale* também foi estimada. Para isso, os dados foram analisados por meio de modelos mistos usando medidas repetidas no tempo. As repetibilidades encontradas para a contagem de carrapatos e número de cópias de DNA de *A. marginale* foram 0,56 e 0,62, respectivamente. As repetibilidades moderada para as contagens de carrapatos e alta para as infecções por *A. marginale*, nas condições do presente estudo, mostrou que fatores intrínsecos do animal hospedeiro são essenciais para determinar as infestações por carrapatos ou infecções por *A. marginale*. As correlações estimadas entre a contagem de carrapatos e o número de cópias de *A. marginale* foram próximas de zero, ou seja, mostram que não é possível que a medida do nível de infecção por *A. marginale* poderia prever o nível de infestação por carrapatos, ou vice-versa.

Palavras-chaves: *Anaplasma marginale*, *Rhipicephalus microplus*, qPCR, correlação, repetibilidade, sistema de criação.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade Anhanguera Taquaral, Campinas-SP; criscarvalho Fiorin@hotmail.com

2 Instituto de Zootecnia, Nova Odessa-SP

3 Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

4 Orientador: Pesquisador do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa-SP; cjverissimo@iz.sp.gov.br



ABSTRACT – *Rhipicephalus microplus* tick is the biological vector of *Rickettsia A. marginale*, and both are considered one of the main parasites that affect Brazilian livestock. Differences in susceptibility to these parasites have been observed within the breeds, suggesting that it may be possible to select a more resistant phenotype. Thus, the aim of the present study was to estimate the repeatability of the *R. microplus* tick infestation and the level of *A. marginale* infection determined using quantitative Real-Time PCR (qPCR) in 20 newborn Holstein calves raised in individual cage systems. In addition to repeatability, correlations between tick counts and level of *A. marginale* infection were also estimated. For this, the data were analyzed using mixed models using repeated measures over time. The repeatability found for the tick count and number of DNA copies of *A. marginale* were 0.56 and 0.62, respectively. Moderate repeatability for tick counts and high repeatability for *A. marginale* infections, under the conditions of the present study, showed that intrinsic factors of the host animal are essential to determine tick infestations or *A. marginale* infections. The estimated correlations between the tick count and the number of copies of *A. marginale* were close to zero, that is, they show that it is not possible that the measurement of the level of infection by *A. marginale* could predict the level of tick infestation, or vice versa.

Keywords: *Anaplasma marginale*, *Rhipicephalus microplus*, qPCR, correlation, repeatability, system breeding.



1 INTRODUÇÃO

Anaplasma marginale é um dos principais problemas sanitários encontrado nas fazendas brasileiras, cujo principal agente transmissor e vetor biológico é o carrapato *Rhipicephalus microplus* (COSTA et al., 2013). Este ácaro está presente em quase todo o território brasileiro (PEREIRA e LABRUNA, 2008), e atualmente, apresenta dificuldade de controle, uma vez que, o uso de medicamentos provoca a pressão seletiva para o aparecimento da resistência genética aos carrapaticidas convencionais (FAZA et al., HIGA et al., 2015).

A transmissão de *A. marginale* pelo carrapato se dá no momento do repasto sanguíneo, o mesmo injeta o agente patogênico no sangue circulante do animal por meio da saliva, sob a forma de corpúsculo inicial, devido a uma invaginação da membrana que dá origem a um vacúolo. *A. marginale* penetra na hemácia dos bovinos, após essa invasão sucede a multiplicação por divisão binária, onde forma um corpúsculo de inclusão, que deixará a hemácia, sem romper a mesma, e invade outras células, difundindo assim o ciclo (KOCAN et al., 2010).

Em relação aos vetores mecânicos, outros insetos hematófagos, como as moscas *Haematobia irritans* e *Stomoxys calcitrans*, também tem papel importante na transmissão de *A. marginale* (Cruz et al., 2011). Além da transmissão iatrogênica que pode ocorrer quando é utilizada a mesma agulha para vários animais durante a vacinação, cirurgias coletivas e transfusão sanguínea sem realizar as devidas esterilizações dos instrumentos utilizados de um animal para o outro (KESSLER, 2001). Muitos fatores epidemiológicos podem interferir com a manifestação da doença, como, por exemplo, a idade do animal, raça e manejo e cepas que existem na propriedade (Silva et al., 2015). O melhoramento genético por seleção para resistência a hemoparasitas em taurinos ou raças oriundas de seus cruzamentos, se possível, seria uma alternativa para facilitar o controle dessa doença e, conseqüentemente, estimularia os criadores a utilizarem animais mais produtivos (Giglioti et al., 2018).

Como a criação de gado Holandês é uma atividade de grande interesse econômico no Brasil, a seleção de animais mais resistentes pode contribuir para a melhoria da produtividade do rebanho, redução do uso de medicamentos e melhoria da qualidade do leite. Assim, o presente estudo teve como objetivos estimar os coeficientes repetibilidades e correlação entre os níveis de infecção de *Anaplasma marginale* e a infestação pelo carrapato *R. microplus*, em bezerros da raça Holandês, criados em sistema de gaiolas individuais, dentro de piquete.



1.1 Material e Métodos

1.1.1 Animais e sistemas de criação

Este estudo foi realizado na fazenda experimental do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, estado de São Paulo, Brasil (22 ° 46'39 " S, 47 ° 17'45 " W; 570 m de altitude). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto de Zootecnia (Protocolo nº 272/18).

Foram acompanhados 20 bezerros da raça Holandês (*B. t. taurus*), (13 machos e 7 fêmeas) com idade média inicial de 14 dias, expostos, desde o nascimento, à infestação por *R. microplus*, criados em sistema de gaiola individual aberta, em um piquete formado por *Cynodon dactylon*. Cada animal ficava preso com uma corrente de 1,3 m a um cabo de aço de 10 m que permitia o movimento dos bezerros na frente de cada gaiola. O espaço entre as gaiolas era de 3 m de modo que não havia contato direto entre eles. A gaiola protegia contra chuva e raios solares, havendo água e feno disponível *ad libitum*. O sistema de aleitamento foi: nos primeiros 30 dias, 6 litros de leite, em duas porções, sendo 3 pela manhã e 3 à tarde; do 31 ao 40º dia, somente 3 litros pela manhã, do 41º ao 60º dia, 1 litro pela manhã.

Foram colhidas amostras de sangue para a realização de ensaios de qPCR e realizadas contagens de carrapato maiores que 4,5mm no lado direito dos animais quinzenalmente, durante os 60 dias do período de amamentação (quatro avaliações), mais uma avaliação realizada 15 dias após o desmame (abrupto), totalizando 100 observações.

1.1.2 Coleta e amostra de extração de DNA

Amostras de sangue foram colhidas da veia jugular de cada animal usando um sistema de vácuo (Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) que continha anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O DNA genômico foi extraído de 60 µL de cada amostra de sangue usando o kit Easy-DNA (nº de catálogo K180001; Invitrogen, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante (nº 2–30, Minute DNA Extraction from Blood Samples), e foi eluído em 60 µL de tampão Tris-EDTA. Todas as amostras foram identificadas e armazenado a -20 ° C até o momento das análises.

1.1.3 PCR em Tempo Real quantitativa (qPCR)

Os ensaios de qPCR para quantificação do nível de infecção por *A. marginale*, foram realizados usando o equipamento Rotor-Gene Q Real Time PCR (Qiagen), utilizando os seguintes primers: *forward* – 5'-TGGATGAAAGCCTGGAGATG-3' e *reverse* – 5'-

TGTTTCCAGACCTTCCCTAACT-3', cujas sequências flanqueiam parte do gene da proteína de principal de superfície b (*msh1b*) e produz amplicons com 119 pares de bases (Giglioti et al. 2018). Resumidamente, a qPCR foi conduzida em um volume final de 10 µL, usando 2 µL HOT FIREPol Evagreen qPCR Supermix (Solis BioDyne, Tartu, Estônia), 0,3 µL de cada *primer* (10 µM), e 2,0 µL de DNA. Os perfis térmicos foram: 12 min a 95 ° C, seguido por 40 ciclos a 95 ° C (15 s), 60 ° C (20 s) e 72 ° C (20 s; extensão e leitura). Após a amplificação, uma curva de dissociação foi obtida em ciclo único, adotando-se um intervalo de 65 a 95°C, com incremento de 0,5°C e detecção de fluorescência tomada a cada cinco segundos. Amostras e controles (positivos e negativos) foram analisados em duplicata. Cada ensaio conteve uma curva padrão para a quantificação do número de cópias (NC) de *A. marginale*, a qual foi construída usando diluições em série com base 10 usando fragmentos de DNA sintético gBlocks (IDT, Coralville, IA, EUA) que continha a sequência alvo de qPCR de *A. marginale* conforme descrito por Giglioti et al. (2018). As diluições com base na curva de calibração de cada gBlocks foram submetidos aos testes qPCR juntamente com as amostras e controles para estimar o número de cópias de DNA de *A. marginale*. A eficiência da reação (E) foi expressa em porcentagem e usando a seguinte fórmula: $\% E = [10^{(-1 / slope)} - 1] \times 100$, onde *slope* = inclinação da derivada (linha tangente) da calibração curva (Pfaff 2001; Vandesompele et al. 2002). O NC do DNA foi calculado pela fórmula descrita por Ke et al. (2006). Os valores de NC encontrado nas diluições das curvas de calibração foram utilizados para estabelecer uma equação de regressão que permite estimar os valores do número de cópias de DNA para o DNA de *A. marginale* para cada amostra. As amostras com desvio padrão $Cq > 0,5$ (duplicado) foram testadas novamente. As amostras com números de cópia de DNA $\log_{10} > 0$ foram consideradas positivas.

1.1.4 Análise estatística

Os NC de DNA de *A. marginale* e contagens de carrapatos foram transformados em $\log_{10}(n + 1)$ para aproximação da distribuição normal dos dados, e em seguida foram analisados usando a metodologia de modelos mistos. Foram utilizados dois modelos: (i) para estimar a repetibilidade e (ii) para estimar as associações entre NC e contagens de carrapatos e comparação de médias. O modelo (i) foi aplicado a cada espécie (carrapato ou hemoparasita) separadamente e incluiu medições repetidas do mesmo animal. O dia da avaliação foi incluída como efeito fixo e foi assumida uma estrutura de covariância auto-regressiva de ordem 1 (AR [1]). O modelo (ii) era multivariado com medições repetidas no mesmo animal, incluindo os efeitos fixos da do dia de avaliação, espécie (carrapato e hemoparasita) e suas interações. Neste modelo, uma estrutura de produto direto (UN@AR [1]) projetada para medidas repetidas multivariadas foi usada como uma



estrutura da matriz de (co)variância. Essa estrutura foi construída tomando o produto Kronecker de uma matriz não estruturada - UN (modelagem covariância entre espécies) com uma matriz de covariância adicional de AR (1) (modelagem covariância ao longo do tempo). O procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (SAS 2002) foi usado para as análises. O as médias obtidas para cada modelo foram comparadas com o teste de *Tukey* ($\alpha = 0,05$).

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As repetibilidades encontradas para a contagem de carrapatos e NC de DNA de *A. marginale* foram 0,56 e 0,62, respectivamente. Seguindo essa mesma sequência as repetibilidades estimadas foram consideradas moderada-alta e alta. Essas estimativas mostraram que, nas condições do presente estudo, usando esse tipo de sistema de criação, tanto a contagem de carrapatos quanto o nível de infecção por *A. marginale* tendem a se repetir entre uma avaliação e outra, principalmente para *A. marginale*, em que a repetibilidade foi ainda mais alta.

A maioria dos trabalhos em que estimaram as repetibilidades da contagem de carrapatos apresentaram estimativas menores, que variaram de baixa a moderada (Mackinnon et al., 1991; Fraga et al., 2003; Giglioti et al., 2016; Giglioti et al., 2018). Contudo, a estimativa de repetibilidade encontrada no presente estudo contrasta com a repetibilidade estimada por Silva et al. (2007) que avaliaram a infestação artificial por *R. microplus* em bovinos de diferentes grupos genéticos e encontraram repetibilidade de 0,65. Vale ressaltar que, embora os animais eram mantidos presos durante as avaliações, as infestações por carrapatos ocorreram de forma natural.

Em relação às infecções por *A. marginale*, ainda são escassos estudos que estimaram a repetibilidade desse hemoparasita. Estudando infecções naturais por *A. marginale* em bovinos da raça Canchim, Giglioti et al. (2018) verificaram que as repetibilidades variaram de acordo com a idade dos animais, sendo que a repetibilidade maior encontrada foi de 0,48 (14 a 19 meses de idade). Segundo esses autores, a resistência as infecções por *A. marginale* pode depender da idade dos animais. Embora não é possível inferir que o tipo de sistema de criação influenciou diretamente a estimativa de repetibilidade, é possível que o nível de parasitemia de *A. marginale* nos carrapatos que infestaram cada animal pode ter influenciado nos resultados. Nesse sistema de criação usado, os animais permaneceram mais tempo no mesmo local, logo a carga de parasitemia por *A. marginale* no carrapato pode ter sido uniforme. Este fator garante maior uniformidade na infecção dos animais e, portanto, permite estimativas mais precisas de repetibilidade e correlações (Giglioti et al., 2020). As frequências de animais positivos para *A. marginale* aumentaram conforme o nível de parasitemia por esse hemoparasita também aumentava (Figura 1).

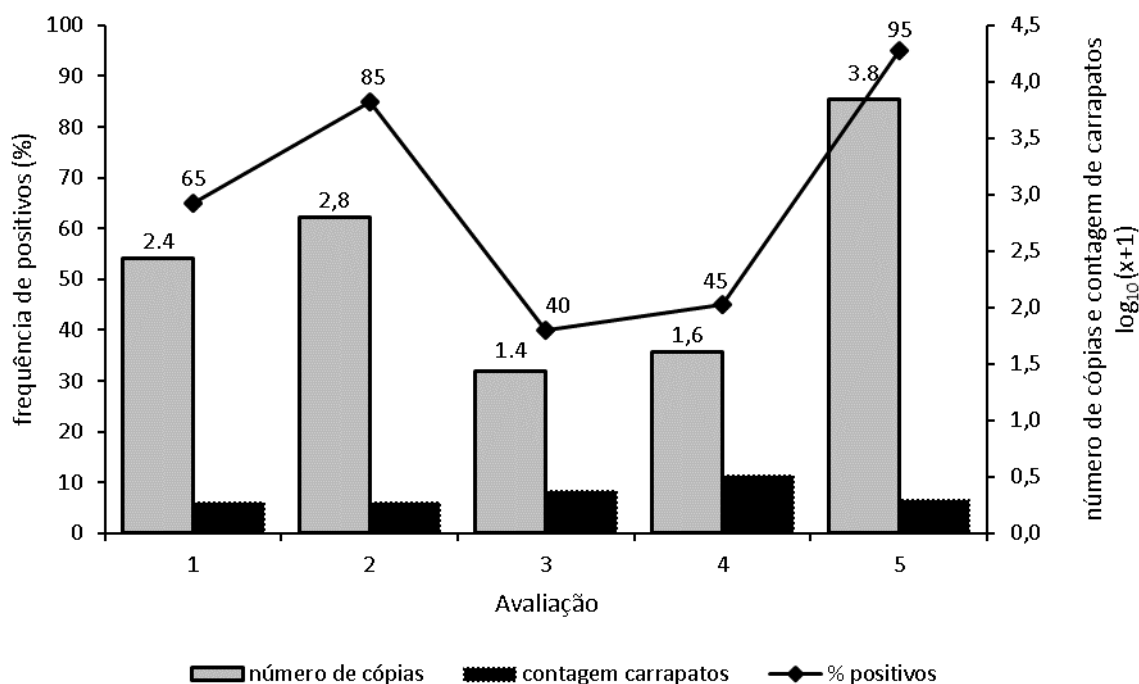


Figura 1. Número de cópias de *Anaplasma marginale*, contagens de carrapato e porcentagem de animais positivos em cada avaliação.

3 CONCLUSÃO

O nível de infecção por *A. marginale* determinados por qPCR pode ser usado como medida fenotípica para caracterizar animais infectados. As repetibilidades moderada para as contagens de carrapatos e alta para as infecções por *A. marginale*, nas condições do presente estudo, mostraram que fatores intrínsecos do animal hospedeiro (genéticos e não genéticos) são essenciais para determinar as infestações por carrapatos ou infecções por *A. marginale*. As correlações estimadas entre a contagem de carrapatos e o número de cópias de *A. marginale* foram próximas de zero, ou seja, mostram que não é possível que a medida do nível de infecção por *A. marginale* poderia prever o nível de infestação por carrapatos, ou vice-versa.

4 AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida, à minha co-orientadora Luciana Morita Katiki e ao Instituto de Zootecnia de Nova Odessa-SP.



5 REFERÊNCIAS

- Costa, J.H.C.; Hötzel, M.J.; Longo, C.; Balcão, L.F. A survey of management practices that influence production and welfare of dairy cattle on family farms in southern Brazil. *J. Dairy Sci.*, 96: 307-317, 2013.
- Cruz, C.E.F.; Raymundo, D.L.; Cerva, C.; Pavarini, S.P.; Dalto, A.G.C.; Corbellini, L.G.; Driemeier, D. Records of performance and sanitary status from a dairy cattle herd in southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, 31:1-9, 2011.
- Faza, A.P.; Pinto, I.S.B.; Fonseca, I.; Antunes, G.R.; Monteiro, C.M.O.; Muniz, M.S.; Martins, M.F.; Furlong, J. Prata, M.C.A. A new approach to characterization of the resistance of populations of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to organophosphate and pyrethroid in the State of Minas Gerais, Brazil. *Exp. Parasitol.*, 134:519-523, 2013.
- Fraga, A.B.; Alencar, M.M.; Figueiredo, L.A.; Razook, A.G.; Cyrillo, J.N.S.G. 2003. Análise de Fatores Genéticos e Ambientais que Afetam a Infestação de Fêmeas Bovinas da Raça Caracu por Carrapatos (*Boophilus microplus*). *R. Bras. Zootec.*, 32:1578-1586, 2003 (Supl. 1).
- Giglioti R.; Oliveira, H.N.; Bilhassi, T.B.; Portilho A.I.; Okino, C.H.; Marcondes, C.R.; Oliveira, M.C.S. Estimates of repeatability and correlations of hemoparasites infection levels for cattle reared in endemic areas for *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.*, 250:78–84, 2018.
- Giglioti, R.; Oliveira, H.N.; Gutmanis, G.; Luciani, G.F.; Azevedo, B.T.; Fiorin, C.F.C.; Andrade, M.F.; Silva, M.A.F.; Filho, A.E.V.; Katiki, L.M.; Hiromi, C., Sena, M.C.O.; Veríssimo, C.J. Correlations and repeatability between *Babesia* spp, infections levels using two dairy cattle breeding. *Exp. Appl. Acarol.*, 81:599-607, 2020.
- Giglioti, R.; Oliveira, H.N.; Santana, C.H.; Ibelli, A.M.G.; Néo, T.A.; Bilhassi, T.B.; Rabelo, M.D.; Machado, R.Z.; Brito, L.G.; Oliveira, M.C.S. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. *Ticks Tick-Borne Dis.*, 7:657–662, 2016.
- Higa, L.O.S.; Garcia, M.V.; Barros, J.C.; Koller, W.W.; Andreotti, R. Acaricide resistance status of *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. *Med. Chem.*, 5:326-333, 2015.
- Kessler, R.H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesq. Vet. Bras.*, 21:177-179, 2001.
- Kocan, K. M.; Fuente, J. de la.; Blouin, E. F.; Coetzee, J. F.; Ewing, S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.*, 167:95-107, 2010.
- Mackinnon, M.J., Meyer, K., Hetzel, D.J.S. Genetic variation and covariation for growth: parasite resistance and heat tolerance in tropical cattle. *Livest. Prod. Sci.*, 27:105-122, 1991.
- Pereira, M.C.; Labruna, M.B. *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. In: *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: biologia, controle e resistência. Marcelo Campos Pereira et al. São Paulo: Med Vet, 2008, p. 15-55.



Silva, J.B., André, M.R., Machado, R.Z., Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves an endemic area for bovine anaplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.*, 7:20-25, 2015.

Silva, R.A.; Corrêa, F.N.; Botteon, R.C.C.M.; Botteon, P.T.L. Infecção natural por hemoparasitos em bezerros submetidos à quimio-profilaxia aos 30 dias de idade. *Rev Bras Parasitol V.*, 16:163-165, 2007.

Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3(7): Research0034, 2002