

**Repetibilidade e associação entre os níveis de infecção por hemoparasitas e infestação por carrapatos em bovinos da raça Canchim**

Rodrigo Giglioti<sup>1</sup>, Henrique Nunes Oliveira<sup>1</sup>, Talita Barban Bilhassi<sup>1</sup>, Ligia Cavani<sup>1</sup>, Cintia Righetti Marcondes<sup>2\*</sup>, Marcia Cristina de Sena Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP, Brazil

<sup>2</sup>Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brazil

\*Autor correspondente: cintia.marcondes@embrapa.br

**Resumo:** As infestações pelo carrapato *R. microplus* são responsáveis pela transmissão dos agentes da Tristeza Parasitária Bovina (TPB), causando grandes prejuízos à pecuária brasileira. Foram estudados os mecanismos envolvidos na dinâmica da interação entre as infestações por carrapatos e as infecções pelos agentes da TPB em 45 bovinos da raça Canchim, por meio de 25 avaliações mensais, divididas em quatro fases, sendo contadas as fêmeas adultas de carrapato e quantificados os números de cópias (NC) do DNA de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* por PCR em tempo real (qPCR). As contagens de carrapatos e os NC foram analisados sob metodologia dos modelos mistos e medidas repetidas no tempo. As repetibilidades estimadas para os hemoparasitas foram baixas a moderadas nas diferentes fases avaliadas. As correlações entre as contagens de carrapatos e NC, e entre NC das diferentes espécies foram baixas ou próximas a zero. As medidas de NC, na maioria das fases consideradas, indicam a capacidade dos animais controlarem a carga parasitária. Serão testados, futuramente, modelos indicativos de seleção para resistência.

**Palavras-chave:** Carrapato, gado de corte, qPCR, seleção.

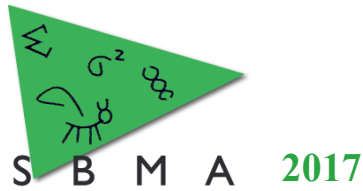
**Repeatability and association between levels of hemoparasite infection and tick infestation in Canchim beef cattle**

**Abstract:** *R. microplus* tick is responsible for the transmission of agents of babesiosis and anaplasmosis that cause great losses to livestock in Brazil. This work studied the interaction between ticks and infections by the hemoparasites in 45 Canchim beef cattle. Twenty five monthly evaluations were carried out, divided into four phases, in which the adult tick females were counted and the copy numbers (NC) of the *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale* DNA were quantified by real time PCR. The ticks and NC count data were analyzed using the mixed model under multivariate models of time-repeated measures. Repeatabilities for the hemoparasites varied between low and moderate in the different phases evaluated. The correlations between tick counts and NC, and among NC in different species were low or were close to zero. NC measurements are consistent indicators of the ability of animals to control parasite level in blood. New studies will be conducted regarding response to selection for resistance.

**Keywords:** Beef cattle, qPCR, selection, ticks.

**Introdução**

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um complexo de doenças que tem como vetor biológico o carrapato *Rhipicephalus microplus* e inclui como agentes os protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e a Rickettsia *Anaplasma marginale*. Este complexo é uma das principais enfermidades que acometem os rebanhos bovinos sendo responsável por importantes perdas econômicas na pecuária tropical e subtropical (Jongejan e Uilenberg, 1994; Bock et al., 2004). O uso dos cruzamentos de raças taurinas com raças zebuínas é uma estratégia que visa melhorar a produção, e ao mesmo tempo a resistência a parasitoses. A seleção para a resistência à TPB em bovinos em raças taurinas ou cruzamentos seria uma alternativa para facilitar o controle desta doença, encorajando criadores na utilização de animais mais produtivos. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi, por meio de estimativas de repetibilidade e correlações entre medidas dos níveis de infecção por *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* e das infestações por *R.*



XII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal  
Ribeirão Preto, SP – 12 e 13 de junho de 2017

*microplus* em bovinos da raça Canchim, criados em área endêmica do estado de São Paulo, verificar se as medidas permitem identificar animais que sejam consistentemente mais resistentes a estes agentes.

### Material e Métodos

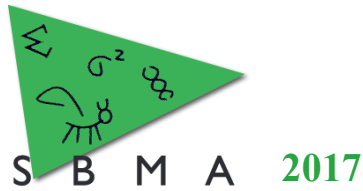
Nesse experimento foram usadas 45 fêmeas da raça Canchim (5/8 Charolês + 3/8 Zebu), com idades entre oito e 10 meses, de duas linhagens diferentes (linhagem Antiga, n=17 e linhagem Nova, n=28). Os animais foram mantidos sem tratamentos contra parasitas e observados mensalmente, durante 25 meses (agosto de 2013 a agosto de 2015). De cada animal, foram contadas todas as fêmeas adultas de carrapatos com tamanho superior a 4 mm de diâmetro de um lado do animal (Wharton e Utech, 1970) e foram colhidas amostras de sangue para a extração de DNA por meio do kit comercial Easy-DNA™ Kit (Invitrogen®). A técnica de PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR) descrita por Buling et al. (2007) e Carelli et al. (2007), para babesias e *Anaplasma* respectivamente, foram adaptadas para as quantificações do NC do DNA dos hemoparasitas nas amostras de sangue. O conjunto de dados foi dividido em quatro fases, de acordo com a idade dos animais: Fase 1 de 8 a 12 meses (colheitas 1 a 6), Fase 2 de 13 a 18 meses (colheitas 7 a 12), Fase 3 de 19 a 24 meses (colheitas 13 a 18) e Fase 4 de 25 a 31 meses (colheitas 19 a 25). Os dados das contagens de carrapatos e NC foram transformados em  $\log_{10}(n + 1)$ . O modelo de análise, considerando medidas repetidas do mesmo animal, incluiu os efeitos de colheita, linhagem e suas interações como fixos e o animal como efeito aleatório. Para estimativa das repetibilidades cada característica foi analisada separadamente, assumindo-se para a estrutura de matriz de (co)variância o modelo auto-regressivo de primeira ordem. Para estimar as correlações em análises com duas espécies de cada vez assumiu-se como estrutura de matriz de covariância o produto direto de uma matriz não estruturada por uma matriz de simetria composta. Neste último caso, também foi incluído no modelo o efeito de espécie, e interações. O procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC) foi utilizado para as análises.

### Resultados e Discussão

Foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para o efeito de espécie de parasita, colheita, e interação espécie x colheita. Não foram verificadas diferenças para o efeito de linhagem e sua interação com colheita. As médias seguidas de erros-padrão do NC do DNA de *B. bovis*, *B. bigemina* e de *A. marginale* foram  $1,87 \pm 0,04$ ,  $1,80 \pm 0,04$  e  $3,35 \pm 0,04$ , respectivamente. Os NC para as diferentes espécies de hemoparasitas diferiram entre si ( $P < 0,05$ ).

Tabela 1. Repetibilidades (diagonal) e correlações (fora da diagonal) estimadas dos números de cópias (NC) do DNA de *A. marginale*, *B. bigemina*, *B. bovis* e contagens de *R. microplus* entre as fases (1: 8 a 12 meses; 2: 13 a 18 meses; 3: 19 a 24 meses; 4: 25 a 31 meses).

Fase*	Espécie	Contagem de <i>R.</i>	Número de cópias (NC)		
		<i>microplus</i>	<i>A. marginale</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bovis</i>
1	<i>R. microplus</i>	<b>0,09</b>	-0,10	0,10	0,09
	<i>A. marginale</i>		<b>0,26</b>	-0,14	0,07
	<i>B. bigemina</i>			<b>0,08</b>	0,03
	<i>B. bovis</i>				<b>0,25</b>
2	<i>R. microplus</i>	<b>0,22</b>	0,17	0,01	0,05
	<i>A. marginale</i>		<b>0,48</b>	-0,13	0,03
	<i>B. bigemina</i>			<b>0,26</b>	0,00
	<i>B. bovis</i>				<b>0,37</b>
3	<i>R. microplus</i>	<b>0,22</b>	0,07	0,01	0,15
	<i>A. marginale</i>		<b>0,38</b>	-0,06	0,14
	<i>B. bigemina</i>		-	<b>0,33</b>	0,14
	<i>B. bovis</i>		-		<b>0,17</b>
4	<i>R. microplus</i>	<b>0,38</b>	0,00	0,08	0,16
	<i>A. marginale</i>		<b>0,22</b>	-0,03	-0,10
	<i>B. bigemina</i>			<b>0,13</b>	0,26
	<i>B. bovis</i>				<b>0,32</b>



## XII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Ribeirão Preto, SP – 12 e 13 de junho de 2017

Observa-se na Tabela 1 que para as contagens de carrapatos a repetibilidade foi maior conforme o aumento da idade dos animais, variando de baixas a moderadas. As repetibilidades do NC dos diferentes hemoparasitas também foram de baixas a moderadas, porém sem apresentar qualquer tendência de aumento com o avanço da idade dos animais (Tabela 1). Há na literatura poucos estudos sobre repetibilidade e associação dos níveis de infecção dos agentes da TPB estimados por meio de técnicas moleculares. Para bovinos da raça Angus, Giglioti et al. (2016) encontraram repetibilidades da ordem de 0,02 e 0,10, respectivamente para *B. bovis* e *B. bigemina*. A maioria das associações observadas foram baixas ou próximas a zero, incluindo-se as correlações entre as contagens de carrapatos e NC dos diferentes hemoparasitas (Tabela 1), resultados semelhantes aos obtidos por Giglioti et al. (2016). Dentre os NC dos diferentes hemoparasitas, as estimativas de correlação entre as duas babesias foram baixas, indicando que o aumento da infecção por uma delas não indica aumento da infecção pela outra, o que também corrobora o resultado obtido por Giglioti et al. (2016). As baixas correlações entre os NC das três espécies de hemoparasitas com as contagens de carrapato não permitem qualquer inferência sobre as primeiras a partir da informação da contagem de carrapatos.

### Conclusão

A repetibilidade da contagem de carrapatos aumentou conforme o aumento da idade dos animais, enquanto a mesma tendência não foi observada nos NC dos diferentes hemoparasitas. Os maiores valores de repetibilidade foram estimados para animais entre 13 e 18 meses de idade (fase 2). Este resultado permite inferir que para esta faixa de idade existem animais que conseguem manter o nível de infecção pelos hemoparasitas mais baixo que outros, em medidas subsequentes. Estes resultados podem ter aplicabilidade no delineamento de experimentos sobre hemoparasitas em bovinos de corte e é indicativo de que pode ser possível a obtenção de um modelo para seleção de animais mais resistentes aos hemoparasitas.

### Agradecimentos

À Fapesp (Processo n. 2013/20513-2) e à EMBRAPA (02.12.02.008.00.00) pelo financiamento.

### Literatura citada

- BOCK, R.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, p. 247-269, 2004.
- BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ASENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBA-CARRETERO, J.C.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Vet. Parasitol.**, v. 147, p. 16-25, 2007.
- CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; CECI, L.; BUONAVOGLIA, C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Vet. Microbiol.**, v. 124, p. 107-114, 2007.
- 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.**, v. 7, n. 5, p. 657-662, 2016.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 3-14, 2004.
- WHARTON, R.H.; UTECH, K.B.W. The relation between engorgement and dropping of *B. microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assesment of thick numbers on cattle. **J. Aust. Entomol. Soc.**, v. 9, p. 171-182, 1970.