

DINÂMICA DA INFECÇÃO DE *Theileria equi* DURANTE INFESTAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Dermacentor nitens* EM EQUINO CRONICAMENTE INFECTADO

Monique Ignácio Davel de Anchieta¹; Tays Araújo de Camilo¹; Huarrisson Azevedo Santos² & Carlos Luiz Massard³

1. Bolsista PIBIC, Discente do Curso de Medicina Veterinária, IV/UFRRJ; 2. Professor do DESP/IV/UFRRJ; 3. Professor do DPA/IV/UFRRJ.

Palavras-chave: Piroplasmose equina; Ixodídeos; transmissão; hemoparasitos.

Introdução

A Piroplasmose equina é uma doença decorrente da infecção causada por *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn e Schein, 1998 e/ou *Babesia caballi* (Nuttall; Strickland, 1912), importantes protozoários transmitidos por carrapatos. Os animais acometidos podem apresentar febre, anemia hemolítica, icterícia, hepato e esplenomegalia, podendo em casos graves, levar ao óbito (DE WAAL, 1992). O animal infectado por *T. equi* permanece portador pelo resto da vida, o que o faz fonte de infecção para os carrapatos vetores (DE WAAL, 1992). No Brasil, estudos experimentais apontam *Rhipicephalus microplus* como o vetor da doença (GUIMARÃES et al., 1998). Contudo, no país, os principais carrapatos que acometem equinos são *Dermacentor nitens* e *Amblyomma cajennense* sensu lato (LABRUNA, 2001). Segundo Denning (1988) e Styller e Coan, (1995) estes carrapatos não são capazes de transmitir *T. equi* para equinos. Entretanto, estudos recentes, realizados nos EUA por Scoles et al. (2013) observaram experimentalmente, a capacidade de transmissão de *T. equi* por *A. cajennense* sensu lato para equinos. Além disso, estudos epidemiológicos demonstraram a presença de DNA de *T. equi* em carrapatos da espécie *D. nitens* em infestações naturais (PECKLE et al., 2013), o que suscita também a hipótese da participação desta espécie na transmissão deste agente. Logo, os objetivos do presente estudo foram avaliar a dinâmica da infecção de *T. equi*, durante a infestação experimental por *D. nitens* em equino cronicamente infectado e verificar a infecção desta espécie de carrapato por este hemoparasito durante a fase experimental no hospedeiro vertebrado.

Metodologia

Fêmeas parcialmente ingurgitadas de *D. nitens* foram obtidas de infestações naturais em equinos da UFRRJ, sendo estes exemplares devidamente lavados, secos, pesados e acondicionados em placas de petri em câmara climatizada (B.O.D.) até o início das posturas. A postura foi removida, pesada e armazenada em seringas de plástico na B.O.D., até o momento da eclosão. As larvas recém emergidas foram utilizadas para infestação experimental em equino cronicamente infectado por *T. equi*. Durante toda a infestação experimental (23 dias), exemplares de *D. nitens*, nas fases evolutivas de larvas, ninfas e adultos foram coletados e acondicionados em "pools". Alguns destes exemplares coletados foram mantidos em B.O.D., para análise posterior após a mudança de estágio. Além disso, amostras de 3 mL de sangue do equino foram coletados por venopunção da veia jugular em tubos a vácuo contendo anticoagulante (EDTA), durante o período experimental. Realizou-se a extração de DNA do material genômico das amostras de sangue e dos carrapatos coletados durante este período, através de kits comerciais (Kit Wizard Genomic DNA Purification, Promega® e DNA Easy Blood and Tissue, Qiagen®). As amostras do DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop®) e alíquotadas em concentrações que variaram de 60 a 100ng/µL. A detecção de *T. equi* nas amostras de DNA de sangue do equino e dos carrapatos foi realizada através da PCR em tempo real (qPCR) conforme protocolo descrito por Kim et al. (2008). Amostras que apresentaram Cq abaixo de 40 ciclos foram consideradas positivas. A parasitemia por *T. equi* foi determinada conforme o valor de Cq obtido da qPCR, sendo que os valores mais próximos de 40 indicam uma carga de parasitos mais baixa. Para avaliar o efeito da infestação pelos carrapatos à parasitemia do equino por *T. equi*, os valores de Cq obtidos foram comparados ao período de infestação e testados através da correlação de Spearman a 5% de significância. As

médias de Cq do início e do final do período experimental foram comparadas através da ANOVA, a 5% de significância. Ambos os testes foram realizados no BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

Resultados e Discussão

Durante a fase de infestação experimental por *D. nitens* foi possível observar a variação da parasitemia do equino por *T. equi*, através dos valores de Cq, obtidos da qPCR. Observou-se que a média geral de Cq foi $31,59 \pm 3,86$, sendo o valor da fase inicial da infestação, $29,86 \pm 3,73$ e a fase final, $33,99 \pm 3,12$, sem haver diferença significativa ($P > 0,05$). Embora seja possível evidenciar um maior grau de parasitemia no início da infestação, não foi evidenciado correlação com o período de infestação por *D. nitens* ($P > 0,05$). Esta variação pode ter sido influenciada somente pelo stress da infestação. Sabe-se que carrapatos da espécie *D. nitens* são transmissores de *B. caballi* nas Américas (PFEIFER-BARBOSA et al., 1992), mas seu envolvimento na infecção e transmissão por *T. equi* não foi comprovado (DENNING, 1988). O resultado do estudo pode estar relacionado à incapacidade de *D. nitens* de multiplicar e transmitir as formas infectantes de *T. equi*, como um vetor competente faria, e assim influenciar na parasitemia do animal infectado. Contudo, a análise sobre a positividade de *D. nitens* por *T. equi* demonstrou que dois “pools” de amostras de carrapatos foram positivas na qPCR; um obtido a partir de larvas ingurgitadas e o outro de ninfas recém emergidas, corroborando outros estudos (PECKLE et al., 2013). A detecção do DNA-alvo de *T. equi* na amostra de larvas pode estar relacionado à presença de sangue infectado no interior do carrapato. No entanto, outra hipótese pode estar relacionada à infecção de *D. nitens* por *T. equi*, mesmo que em menor grau, como ocorreria em um vetor biológico. A presença do DNA-alvo de *T. equi* em uma amostra de ninfas recém emergidas reforça esta possibilidade, uma vez que, por serem recém emergidas, apresentavam pouco ou nenhum resquício de sangue infectado em seu interior.

Conclusão

A infestação experimental por *D. nitens* em um equino infectado por *T. equi* não promoveu alteração no grau de parasitemia do animal por este hemoparasito. A detecção de DNA-alvo em ninfas recém emergidas de *D. nitens*, alimentadas como larva em equino cronicamente infectado por *T. equi*, demonstra a possibilidade deste carrapato em se infectar pelo agente da Theileriose equina. Novos estudos são necessários para avaliar a capacidade de *D. nitens* em se infectar e transmitir este agente para os equinos.

Referências Bibliográficas

- AYRES, M. et al. BioEstat 5.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas, Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, 380p, 2007.
- DE WAAL, T. Equine piroplasmiasis: a review. *British Veterinary Journal*, v.148, n.1, p.6–14, 1992.
- DENNING, F. Unsuccessful attempts at transmission of *Babesia equi* by *Anocentor nitens* and *Amblyomma cajennense*. Dissertation - Hannover Veterinary College, 1988.
- GUIMARÃES, A. M. et al. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. *Parasitology Research*, v.84, n.4, p.323-327, 1998.
- KIM, C. et al. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Veterinary Parasitology*, v.151, n.2-4, p.158–163, 2008.
- LABRUNA, M.B. et al. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.97, p.1-14, 2001.
- PECKLE, M. et al. Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brasil, *Parasitology Research*, v.112, p.2017-2025, 2013.
- PFEIFER-BARBOSA, I.B. et al. Diagnosis of natural infection with *Babesia caballi* (Nuttall & Strickland, 1910) in horses and *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) in Itaguaí, Rio de Janeiro, Brazil. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v.15, n.1, p.105-107, 1992.
- SCOLES, G.A.; UETI, W.M. *Amblyomma cajennense* is an intrastadial biological vector of *Theileria equi*. *Parasites & Vectors*, v.6, n.306, 2013.

STILLER, D.; COAN, M.E. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmosis. *Veterinary Parasitology*, v.57, n.1-3, p.97-108, 1995.