

Influence of subclinical infection by agents of tick fever in milking dairy cows

Influencia de la infección subclínica por agentes de la fiebre por garrapatas en vacas lecheras

Rafael Pazinato,¹ M.Sc, Gustavo Machado,² PhD, Vanderlei Klauck,¹ M.Sc, Willian M. Radavelli,¹ M.Sc, Jhonatan P. Boito,¹ M.Sc, Paulo H.E. Weis,³ PhD, Luiz Claudio Miletto,³ PhD, Matheus D. Baldissera,⁴ M.Sc, Lenita M. Stefani,¹ PhD, Aleksandro S. Da Silva,^{1*} PhD

¹Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Department of Animal Science, Chapeco, SC, Brazil. ²Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Veterinary Epidemiology, Porto Alegre, RS, Brazil. ³Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Department of Animal Production, Lages, SC, Brazil. ⁴Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Department of Microbiology and Parasitology, Santa Maria, RS, Brazil. *Correspondence: aleksandro_ss@yahoo.com.br

Received: October 2015; Accepted: February 2016.

ABSTRACT

Objective. The objective of this study was to evaluate the effect of subclinical infection by agents of tick fever in dairy cattle on milk parameters, such as production, composition, and quality. **Materials and methods.** The study was conducted in a private farm with 75 free-stall-housed dairy cows, from which 37 were evaluated. Monthly, individual milk samples were collected for compositional (fat, lactose, protein, and total solids) and quality (somatic cell counts (SCC)) analyses. In addition, blood samples were collected in order to identify cows that were tick fever-negative and positive by PCR for one or more of the following etiological agents: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Results.** The results showed increased SCC in positive animals for at least one of the agents when compared to non-infected cows ($p < 0.05$). Milk production was significantly lower in *A. marginale* positive animals ($p < 0.05$). An increase of about 40% in milk solids content was found in *B. bovis* positive cows. Also, an increment of approximately 23% in lactose was found on cows positives for *B. bigemina*. **Conclusions.** We may conclude that the presence of at least one of these parasites in dairy cattle affects composition or quality of their milk.

Keywords: Infectious agents, SCC, lactose, total solids (Source: CAB, MeSH).

RESUMEN

Objetivo. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la infección subclínica por agentes de la fiebre por garrapatas en el ganado lechero en producción de leche, la composición y calidad. **Materiales y métodos.** El estudio se realizó en una finca privada con 75 vacas lecheras alojadas-libre puesto, y de estas se evaluaron 37. Se recogieron muestras de leche individuales mensuales para determinar la composición (grasa, lactosa, proteína y sólidos totales) y la calidad (recuento de células somáticas (SCC)). Además, se recogieron muestras de sangre para identificar vacas que fueron negativas a fiebre de garrapatas y positivos por PCR para uno o más de los siguientes agentes etiológicos: *Babesia*

bovis, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*. **Resultados.** Los resultados mostraron un aumento de SCC en los animales positivos, al menos para uno de los agentes cuando se comparó con vacas no infectadas ($p < 0.05$). La producción de leche fue significativamente menor en *A. marginale* animales positivos ($p < 0.05$). Un aumento de aproximadamente el 40% en el contenido de sólidos de la leche fue encontrado en vacas positivas a *B. bovis*. También, un incremento de aproximadamente el 23% de la lactosa se encontró en vacas positivas para *B. bigemina*. **Conclusiones.** Se puede concluir que la presencia de al menos uno de estos parásitos en el ganado lechero afecta composición o calidad de su leche.

Palabras clave: Agentes infecciosos, SCC, lactosa, sólidos totales (Fuente: CAB, MeSH).

INTRODUCTION

In recent years, milk production has gained attention in the agribusiness scenario of Santa Catarina state, Brazil. The incidence of cattle diseases is also growing along with production increase, and tick fever caused by *Babesia* spp., and *Anaplasma* spp., is one of them. In Brazil, the main etiological agents of tick fever are *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *B. bigemina* (1). The areas of enzootic stability are those in which there is a balance between immunity and disease, i.e. 75% of the animals older than nine months are carriers of these blood parasites. Therefore, we can infer that most of these animals are acquiring the infection when young (2,3), this situation also in western Santa Catarina, area that is inserted the studied herd. This infection is asymptomatic in older animals since reinfections occur due to the maintenance of the tick *Rhipicephalus microplus*, responsible for transmission of tick fever agents (4), which causes infestations in cattle all old. Thus, it results in a low mortality by blood parasites in adult animals. In endemic areas, where the vector population is high throughout the year, most young animals are infected, which leads to natural resistance to the disease (2,3).

Studies have shown that asymptomatic infections by infectious agents may alter the composition and quality of the milk, i.e. according to the literature in cases of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus caprae* in goats (5), where SCC significantly increased in cases of intra-mammary infections. Similar findings have been reported in cattle (6). Similarly, other infectious diseases can affect milk quality (SCC), e.g. bovine viral diarrhea in dairy cattle (7,8). According to researchers, these alterations may be related immune responses the host's against infectious agents, as agents of tick fever. Thus, the objective of this study was to evaluate the influence of subclinical infection by agents of tick fever in dairy cattle on milk production, chemical composition and quality.

INTRODUCCION

En los últimos años se ha prestado mayor atención a la producción de leche en el ámbito agroindustrial del estado de Santa Catarina, Brasil. Junto con el aumento de la producción, también está creciendo la incidencia de las enfermedades del ganado, y una de ellas es la fiebre por garrapatas causada por *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp. En Brasil, los principales agentes etiológicos de la fiebre por garrapatas son *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* y *B. bigemina* (1). Las áreas de estabilidad enzoótica son aquellas en las que existe un balance entre la inmunidad y la enfermedad, es decir el 75% de los animales mayores de nueve meses son portadores de estos parásitos sanguíneos. Por lo tanto, podemos inferir que la mayoría de estos animales adquieren la infección cuando son jóvenes (2,3). Se incluye en el rebaño estudiado el área de Santa Catarina, en donde también se presenta dicha situación. Esta infección es asintomática en animales mayores ya que se producen reinfecciones debido a la presencia de la garrapata *Rhipicephalus microplus*, responsable de la transmisión de agentes de la fiebre por garrapatas (4), la cual causa infestaciones en los bovinos de edad avanzada. Por lo tanto, tiene como resultado una baja mortalidad por parásitos sanguíneos en animales adultos. En áreas endémicas, en donde la población de vectores es alta durante todo el año, la mayoría de animales jóvenes están infectados, lo que causa una resistencia natural a la enfermedad (2,3).

Los estudios han mostrado que las infecciones asintomáticas debidas a agentes infecciosos pueden alterar la composición y calidad de la leche, esto es de acuerdo con la literatura, en casos de mastitis subclínica causada por el *Staphylococcus epidermidis* y el *Staphylococcus caprae* en cabras (5), en los cuales el SCC aumentó significativamente cuando se presentaron infecciones intra-mamarias. Se han reportado hallazgos similares en los bovinos (6). De forma similar, otras enfermedades infecciosas pueden afectar la calidad de la leche (SCC), por ejemplo la diarrea viral bovina en el ganado lechero (7,8). Según los investigadores, estas alteraciones se pueden relacionar con las respuestas inmunes del huésped contra los agentes infecciosos, tales

MATERIALS AND METHODS

Local and animals. Blood and milk samples were initially collected from 75 Jersey cows with average body weight of 420 Kg and 2 to 4 years of age of a dairy farm located in Quilombo city (Western part of Santa Catarina state, Southern Brazil - Latitude: 26°43'34" S; Longitude: 52°43'14" W). Lactating animals were kept in free-stall housing system with three milking each day. They were fed with 20% crude protein concentrate, Tifton 85 hay, whole-plant corn silage, vitamin and mineral supplements.

Blood samples were prepared for *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale* PCR analyses at the beginning and at the end of the experiment (months 0 and 6, respectively) (9-11). Based on PCR results, animals that were negative for all agents were grouped separated from those considered positive for at least one agent.

Milk samples were individually collected at intervals of 30 days for the assessment of quality (SCC) and composition (fat, protein, lactose, and total solids), resulting in a total of seven sampling times. Sampling was performed during midday after the California Mastitis Test (CMT). Animals CMT positives were excluded from the study. Milk samples were placed in plastic bottles provided by the laboratory that performed the analysis, identified with the earring number of each animal, stored in a styrofoam box with ice (2 to 8°C), and immediately transported to the laboratory.

Molecular analysis of tick fever etiological agents. For DNA extraction, 200 µL of blood were suspended in lysis buffer (10 mM Tris, pH 7.4/10 mM NaCl/25 mM EDTA/1% SDS) and Proteinase K (100 µg/mL), and incubated in a water bath at 42°C for 12 hours. DNA was purified using phenol, phenol-chloroform (1:1), and chloroform. A final centrifugation (14.000×g for 10 min) was carried out between each step, where the supernatant was recovered and forwarded to the next stage (9-11).

Purified DNA was then precipitated with isopropanol (60% solution) and washed with 70% solution of ethanol. The alcohol was evaporated in a Plus concentrator (Eppendorf) at 45°C for 10 min. The resulting DNA was then eluted in 50 mL of ultrapure DNase free water. After the extraction, DNA concentration was measured using NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, NanoDrop 2000). DNA was diluted to a minimum concentration of 20 ng/µL (9-11).

como los de la fiebre por garrapatas. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de la infección subclínica, producida por agentes de la fiebre por garrapatas en el ganado lechero, sobre la producción, la composición química y la calidad de la leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y animales. Inicialmente se recogieron muestras de sangre y de leche de 75 vacas Jersey, con un peso promedio de 420 Kg y de 2 a 4 años de edad, en una granja lechera localizada en la ciudad de Quilombo (parte occidental del estado de Santa Catarina, al sur de Brasil, Latitud: 26°43' 34" S; Longitud: 52°43' 14" W). Los animales lactantes se mantuvieron en un sistema de alojamiento de establo con tres ordeños diarios. Se alimentaron con concentrado del 20% de proteína cruda, heno Tifton 85, maíz integral de ensilaje y suplementos de vitaminas y minerales.

Se prepararon muestras de sangre para el análisis PCR de *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale* al comienzo y al final del experimento (0 y 6 meses respectivamente) (9-11). Basándose en los resultados PCR, los animales que resultaron negativos para todos los agentes se agruparon separados de los considerados positivos para al menos un agente.

Las muestras de leche se recogieron individualmente, en intervalos de 30 días, para la evaluación de calidad (SCC) y de composición (grasa, proteína, lactosa y sólidos totales), dando como resultado un total de siete períodos de muestreo. Dicho muestreo se llevó a cabo durante el mediodía después de la prueba CMT (California Mastitis Test). Los animales positivos para CMT se excluyeron del estudio. Las muestras de leche se colocaron en botellas plásticas suministradas por el laboratorio que llevó a cabo el análisis, identificadas con el número de arete de cada animal, almacenadas en una caja de poliestireno extruido con hielo (2 a 8°C), e inmediatamente transportadas al laboratorio.

Análisis molecular de los agentes etiológicos de la fiebre por garrapatas.

Para la extracción del ADN, se suspendieron 200 µL de sangre en una solución tampón lisis (10 mM Tris, pH 7,4 / 10 mM NaCl / 25 mM EDTA / 1% SDS) y Proteinasa K (100 µg/ml), y se incubaron en un baño de agua a 42°C por 12 horas. El ADN se purificó usando fenol, fenol-cloroformo (1:1), y cloroformo. Se efectuó una centrifugación final (14.000×g por 10 min) entre cada etapa, se recuperó el líquido sobrenadante y se remitió a la siguiente etapa (9-11).

For DNA amplification, Multiplex PCR was carried out in 0.2 mL microtubes on a final volume of 10 μ L containing: 1U of Taq polymerase (GoTaq® Hot Start Polymerase, Promega), 84.5 pmol of each primer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM magnesium chloride, 1 μ L of 10x green buffer (Promega), 1 μ L of DNA (20 ng/ μ L) and ultrapure water. A negative control was used to ensure the quality of sensitivity and specificity of the technique, using the same procedure before mentioned, replacing the genomic DNA by ultrapure DNase free water. The following primers were used: BoF 5' CAC GAG GAA GGA ACT ACC GAT GTT GA3' and BoR 5' CCA AGG AGC TTC AAC GTA GCA GGT CA3', which resulted in an amplified fragment of 356 pb for *Babesia bovis* according to Suarez et al (9); BiIA 5' CAT CTA ATT TCT CTC CAT ACC CCT CC 3' and BiIB 5' CCT CGG CTT CAA CTC TGA TGCCAA AG 3', resulting in an amplified fragment of 278pb for *B. bigemina* according to Figuero et al (10); and 1773F 5' TGT GCT TAT GGC AGA CAT TTC C 3' and 2957R 5' AAA CCT TGT AGC CCC AAC TTA TCC 3', which resulted in an amplified fragment of 1000pb for *A. marginale* according to Lew et al (11). Amplification involved a hot start of 5 min at 95°C, followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 58°C, 1 min at 72°C, and a final extension step of 10 min at 72°C. PCR products were separated by electrophoresis through a 2% agarose gel. Positive and negative controls for these etiological agents were added to the reaction, to validate the PCR to *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale*.

Experimental design. Dairy cows (n=37) were selected based on PCR results for the etiologic agents of tick fever. Animals on the same stage of lactation and with no diagnosis of mastitis were selected. In this group, 17 animals were positives for *A. marginale*, 13 for *B. bovis*, 15 for *B. bigemina*, considering that 11 of them were positives for two or three of these etiological agents. Seven cows were PCR-negatives for these etiological agents, and therefore they were used as negative control.

Milk analyses. Milk chemical composition (fat, protein, lactose, total solids) and urea were analyzed via infrared spectroscopy (IDF Standard 141C:2000). The SCC was determined using flow cytometry (IDF Standard 148-2:2006).

Statistical analysis. The data were analyzed using linear mixed model considering animals studied as replications. The parameters measured were: fat, protein, lactose, total solids and SCC. Milk production was considered a dependent variable and the tick fever agents analyzed were *B. bovis*, *B. bigemina*, and *A. marginale*. Two variables were considered regarding agent

El ADN purificado se precipitó luego con isopropanol (solución al 60%) y se lavó con solución al 70% de etanol. El alcohol se evaporó en un concentrador Plus (Eppendorf) a 45°C durante 10 minutos. El ADN resultante se eluyó entonces en 50 ml de agua ultrapura libre de ADNasa. Después de la extracción, el ADN concentrado se midió utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, NanoDrop 2000). El ADN se diluyó hasta una concentración mínima de 20 ng/ μ l (9-11).

Para la amplificación del ADN, se llevó a cabo la prueba PCR Multiplex en microtubos de 0,2 ml en un volumen final de 10 μ l que contenía: 1U de polimerasa Taq (GoTaq® Hot Start Polymerase, Promega), 84,5 pmol de cada cebador, 0,2 mM dNTPs, 1.5 mM de cloruro de magnesio, 1 μ l de 10x solución tampón verde (Promega), 1 μ l de ADN (20 ng/ μ l) y agua ultrapura. Se utilizó un control negativo para asegurar la calidad de la sensibilidad y especificidad de la técnica, usando el mismo procedimiento anteriormente mencionado, reemplazando el ADN genómico por agua ultrapura libre de ADNasa.

Se utilizaron los siguientes cebadores: BoF 5' CAC GAG GAA GGA ACT ACC GAT GTT GA3' y BoR 5' CCA AGG AGC TTC AAC GTA GCA GGT CA3', los cuales produjeron un fragmento amplificado de 356 pb para *Babesia bovis*, de acuerdo con Suárez y colaboradores (9); BiIA 5' CAT CTA ATT TCT CTC CAT ACC CCT CC 3' y BiIB 5' CCT CGG CTT CAA CTC TGA TGC CAA AG 3', resultando un fragmento amplificado de 278 pb para *B. bigemina*, de acuerdo con Figuero y colaboradores (10); y 1773F 5' TGT GCT TAT GGC AGA CAT TTC C 3' y 2957R 5' AAA CCT TGT AGC CCC AAC TTA TCC 3', resultando un fragmento amplificado de 1000 pb para *A. marginale* de acuerdo con Lew y colaboradores (11). La amplificación implicó un inicio caliente de 5 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C, y una etapa de extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de la prueba PCR se separaron por electroforesis a través de un gel de agarosa al 2%. Se agregaron a la reacción controles positivos y negativos para estos agentes etiológicos, con el fin de validar la prueba PCR para *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*.

Diseño experimental. Se seleccionaron vacas lecheras (n=37) basándose en los resultados del análisis PCR para los agentes etiológicos de la fiebre por garrapatas. Se seleccionaron animales en la misma etapa de lactancia y sin diagnóstico de mastitis. En este grupo, 17 animales resultaron positivos para *A. marginale*, 13 para *B. bovis*, 15 para *B. bigemina*, considerando que 11 de ellos resultaron positivos para dos o tres de estos agentes etiológicos. Siete vacas resultaron PCR-negativas para estos agentes etiológicos y por lo tanto se usaron como control negativo.

infection: one when all the agents were analyzed at the same time (1 – positive or 0 – negative) and a dichotomous variable considering simple infection or mixed infection. In all models the month of collection was considered a covariate for potential correction of the time effect. Graphical analysis was performed for checking the normality of residuals. Residual values and predicted values were analyzed in order to verify the normality and homoscedasticity conditions. There were no issues regarding the aforementioned premises. For all linear mixed models, the model adequacy was assessed by measuring the $-2\log$ likelihood, the Akaike information criterion (AIC) and the Bayesian information criterion (BIC). Significance was set at 5% ($P \leq 0.05$). All analyses were performed in v.2.15.2 R (R development Core Team, 2012). A univariate model was built for each measured parameter: fat, protein, total solids and SCC in their gross values (continuous variables). The independent variables analyzed were the etiological agents: *B. bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma*. All response variables were dichotomized (responses were either 1 or 0). Finally, the measured parameters (fat, protein, lactose, total solids, and SCC) were correlated to milk production via *Spearman* correlation coefficient. Correlation between age of cows and SCC values was also done via *Spearman* correlation coefficient.

RESULTS

When comparing negative and positive animals for the three etiological agents of tick fever, a significant relationship ($p=0.02$) regarding SCC was observed. This means that infected animals showed higher values of SCC (Figure 1). This effect on SCC was mainly due to *A. marginale* infection (odds ratio 1:33, 95% CI, 1.04-1.69). There was

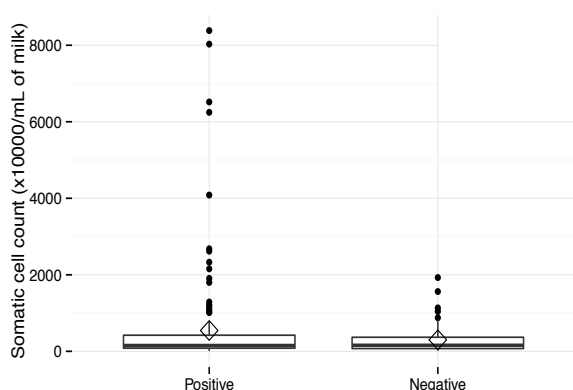


Figure 1. Somatic cell counts (SCC) in milk from cows positive for one or more etiological agent of tick fever (*Babesia* spp e *Anaplasma marginale*) when compared to negative cows.

Análisis de la leche. Se analizaron la composición química de la leche (grasa, proteína, lactosa, sólidos totales) y de la úrea mediante espectroscopía infrarroja (IDF Standard 141C:2000). Se determinó la SCC utilizando citometría de flujo (IDF Standard 148-2:2006).

Análisis estadístico. Los datos se analizaron usando el modelo mixto lineal considerando los animales estudiados como réplicas. Los parámetros medidos fueron: grasa, proteína, lactosa, sólidos totales y SCC. La producción de leche se consideró una variable dependiente y los agentes de fiebre por garrapatas analizados fueron *B. bovis*, *B. bigemina*, y *A. marginale*. Se tuvieron en cuenta dos variables respecto al agente de infección: una cuando todos los agentes se analizaron al mismo tiempo (1-positivo o 0 – negativo) y una variable dicotómica considerando infección simple o mixta. En todos los modelos se consideró el mes de recolección como una covariable para una posible corrección del efecto del tiempo. Se realizó un análisis gráfico para revisar la normalidad de los residuos. Se analizaron los valores residuales y los valores previstos con el fin de verificar las condiciones de normalidad y homoscedasticidad. No se presentaron problemas respecto a las premisas mencionadas. Para todos los modelos mixtos lineales, se evaluó la idoneidad del modelo midiendo la probabilidad $-2\log$, el criterio de información Akaike (AIC por las siglas en inglés) y el criterio de información Bayesian (BIC por sus siglas en inglés).

La significancia se fijó en 5% ($p \leq 0.05$). Todos los análisis se realizaron en v.2.15.2 R (R development Core Team, 2012). Se construyó un modelo univariable para cada parámetro medido: grasa, proteína, sólidos totales y SCC en sus valores brutos (variables continuas). Las variables independientes analizadas fueron los agentes etiológicos: *B. bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma*. Todas las variables de respuesta se dicotomizaron (las respuestas eran 1 ó 0). Por último, los parámetros medidos (grasa, proteína, lactosa, sólidos totales y SCC) se correlacionaron con la producción de leche a través del coeficiente de correlación *Spearman*. La correlación entre la edad de las vacas y los valores SCC también se hizo mediante dicho coeficiente.

RESULTADOS

Al comparar los animales negativos y positivos para los tres agentes etiológicos de la fiebre por garrapatas, se observó una relación significativa ($p=0.02$) respecto al SCC. Esto significa que los animales infectados mostraron valores más altos de SCC (Figura 1). Este efecto se debe principalmente a la infección con *A. marginale* (relación de probabilidad 1:33, IC del 95%, 1.04-1.69). No hubo correlación entre la edad de las vacas y los valores

no correlation between age of cows and SCC values ($p>0.05$). Milk protein, fat, total solids and lactose contents were not affected by the infection of tick fever agents in this statistical model. There was no significant relation between milk compositions and the presence or absence of mixed infection. Therefore, mixed infections did not induce changes in the quality of milk when compared to simple infection.

The three etiological agents of tick fever were individually evaluated regarding their effects on milk composition during the first six months of the study (Table 1, 2, and 3). A significant relation was observed between milk production and *A. marginale* infection, resulting on a 45% lower in this parameter (Table 3; Figure 2A). Also, positive animals for *B. bigemina* showed increase levels of lactose (23%,

de SCC ($p>0.05$). Los contenidos de proteína de la leche, grasa, sólidos totales y lactosa no se vieron afectados por la infección de agentes de la fiebre por garrapatas en este modelo estadístico. No hubo relación significativa entre las composiciones de la leche y la presencia o ausencia de infección mixta. Por lo tanto, cuando se comparan las infecciones mixtas con las simples no se inducen cambios en la calidad de la leche.

Se evaluaron individualmente los tres agentes etiológicos de la fiebre por garrapatas, respecto a sus efectos sobre la composición de la leche durante los primeros seis meses del estudio (Tabla 1, 2 y 3). Se observó una relación significativa entre la producción de leche y la infección por *A. marginale*, resultando este parámetro un 45% inferior (Tabla 3; Figura 2A). También, los animales positivos por *B. bigemina* mostraron niveles superiores de lactosa (23%, $p=0.04$, relación de probabilidad 1:23, IC del 95%, 1.03-1.50) (Tabla 1; Figura 2B), y los sólidos totales de la leche de los animales infectados con *B. bovis* aumentaron en un 40%, $p=0.05$ (relación de probabilidad 1:40, IC del 95%, 1.21-1.72) (Tabla 2; Figura 2C). Los demás parámetros evaluados no cambiaron, lo cual puede estar relacionado con la presencia de babesiosis ($p>0.05$; Tablas 1 y 2). No se observó relación entre la infección *A. marginale* y la composición química de la leche ($p>0.05$, Tabla 3). Además no se observó correlación significativa al comparar los parámetros medidos y la producción de leche. Los animales con infecciones simples o mixtas por agentes de fiebre por garrapatas no mostraron diferencias en los niveles de urea en las muestras de leche ($p>0.05$). Tampoco hubo correlación entre los niveles de urea y la composición y calidad de la leche ($p>0.05$).

Table 1. Effect of infection by *Babesia bovis* in dairy cattle over milk composition (protein, total solids, lactose and fat) and quality (SCC) compared to cows negative for this etiological agent of tick fever.

Variable	groups	Median	Amplitude	Odds rate (CI 95%)	P
Protein	Positive	3.51	5.18	1.37(0.32-1.48)	0.79
	Negative	3.49	1.63	-	
Total solids	Positive	13.79	8.39	1.40(1.21-1.72)	0.05
	Negative	13.44	17.24	-	
Lactose	Positive	4.58	1.93	0.93(0.81-4.02)	0.30
	Negative	4.73	8.83	-	
Fat	Positive	4.59	1.80	1.78 (0.92-2.03)	0.93
	Negative	4.31	10.22	-	
Milk production	Positive	23.5	19	1.45 (0.56-2.32)	0.53
	Negative	22	29	-	
SCC	Positive	153	6501	0.99 (0.81-3.40)	0.90
	Negative	167	8376	-	

Table 2. Effect of infection by *Babesia bigemina* in dairy cattle over milk composition (protein, total solids, lactose and fat) and quality (SCC) compared to cows negative for this etiological agent of tick fever.

Variable	Groups	Median	Amplitude	Odds rate (CI 95%)	P
Protein	Positive	3.46	1.60	1.14 (0.93-1.39)	0.17
	Negative	3.50	5.18	-	
Total solids	Positive	13.71	17.06	0.80 (0.72-1.08)	0.21
	Negative	13.62	10.91	-	
Lactose	Positive	4.65	1.65	1.23 (1.03-1.50)	0.04
	Negative	4.57	1.95	-	
Fat	Positive	4.47	9.93	1.19 (0.98-1.35)	0.25
	Negative	4.59	10.88	-	
Milk production	Positive	22	29	0.32 (0.12-3.41)	0.31
	Negative	23	27	-	
SCC	Positive	172	4052	1.02 (0.75-1.39)	0.70
	Negative	153	8376	-	

Table 3. Effect of infection by *Anaplasma marginale* in dairy cattle over milk composition (protein, total solids, lactose and fat) and quality (SCC) compared to cows negative for this etiological agent of tick fever.

Variable	Groups	Median	Amplitude	Odds rate (CI 95%)	P
Protein	Positive	3.50	2.24	0.57 (0.40-2.28)	0.20
	Negative	3.49	5.18	-	
Total solids	Positive	13.62	8.48	1.00 (0.99-4.30)	0.21
	Negative	13.73	17.24	-	
Lactose	Positive	4.60	1.80	0.93 (0.09-1.84)	0.41
	Negative	4.58	1.95	-	
Fat	Positive	4.44	8.14	0.13(0.10-1.34)	0.70
	Negative	4.62	10.98	-	
Milk production	Positive	21	30	6.31 (1.03-7.23)	0.04
	Negative	24	28	-	
SCC	Positive	165	1911	0.96 (0.80-1.46)	0.66
	Negative	150	8376	-	

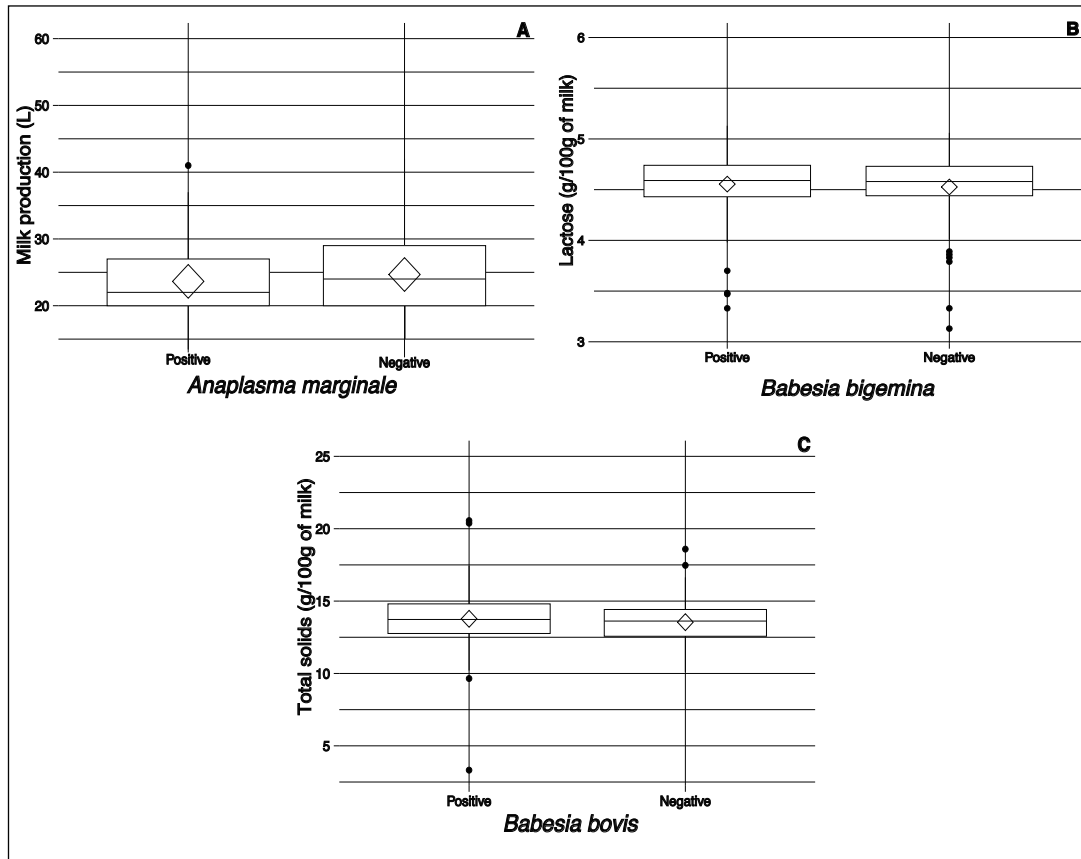


Figure 2. Volume of milk produced from cows infected by *Anaplasma marginale* (A), lactose levels in milk from cows infected by *Babesia bigemina* (B), and total solids in milk from cows infected by *Babesia bovis* (C), when compared to cows negative for these agents.

$p=0.04$, odds ratio 1:23, 95% CI, 1.03-1.50) (Table 1; Figure 2B), and milk total solids from *B. bovis* infected animals was increased by 40%, $p=0.05$ (odds ratio 1:40, 95% CI, 1.21-1.72) (Table 2; Figure 2C). All other evaluated parameters did not change, which may be related to the presence of babesiosis ($p>0.05$; Tables 1 and 2). No relation was observed between *A. marginale* infection and the chemical composition of milk ($p>0.05$, Table 3). Moreover, no significant correlation was observed when comparing the measured parameters and the milk production. Animal with single or mixed infections by agents of tick fever did not show differences on urea levels in milk ($p>0.05$) samples. There was also no correlation between urea levels and milk composition and quality ($p>0.05$).

DISCUSSION

The results show that cows infected by at least one of the etiological agents of tick fever had higher counts of somatic cells when compared to the negative animals. SCC from infected animals

DISCUSION

Los resultados muestran que las vacas infectadas con al menos uno de los agentes etiológicos de la fiebre por garrapatas tuvieron recuentos de células somáticas más altos en comparación con los animales negativos. El SCC de los animales infectados alcanzó 8×10^6 células/ml, cuatro veces más alto que en las vacas no infectadas. Esto muestra que incluso las infecciones subclínicas pueden afectar la calidad de la leche. Como se informó en la literatura, los agentes infecciosos pueden influenciar el SCC de las vacas lecheras ya que la infección puede estimular una respuesta inmune y por lo tanto, aumentar el número de leucocitos. Se debe observar que todas las células presentes en la leche son células somáticas, incluyendo las células originadas del flujo sanguíneo como leucocitos y células descamadas del epitelio secretor (6-8), lo cual puede explicar el aumento en el SCC observado. Los mismos autores también afirmaron que la mayoría de leucocitos se movilizan desde el flujo

reached 8×10^6 cells/mL, four times higher than non-infected cows, which shows that even subclinical infections can affect milk quality. As reported in the literature, infectious agents can influence SCC of dairy cows since the infection may stimulate an immune response and thus, increases the number of leukocytes. It should be noticed that all cells present in milk are somatic cells, including cells originated from the blood stream as leukocytes and peeling cells from the secretory epithelium (6-8), which may explain the increase in SCC observed. The same authors also stated that most leukocytes are mobilized from the bloodstream into the mammary tissue after changes in the capillary permeability. Milk from cows with intramammary infections may show increased numbers of immune cells, leading to a predomination of neutrophils, followed by macrophages and lymphocytes, while the number of epithelial cells remains unchanged (12,13). Previous study showed that bovine viral diarrhea affects SCC (8), the lack of information concerning infectious diseases motivated the present study on the relationship between milk composition and quality on dairy cattle with tick fever.

Milk from *B. bigemina* positive animals showed 23% increase on lactose levels, which disagrees with other authors findings who reported a decrease when mastitis and high SCC are present (14). The lactose increase evidenced by the current study was unexpected because, as mentioned above, lactose and fat contents are adversely affected in inflammatory processes, in addition to milk production reduction may be related indexes of carbohydrates consumed by animals, despite receiving the same diet, and the intake may vary between animals.

Total solids content has a tendency to decrease (3-12%) with increasing SCC, what is mainly related to mastitis cases (15). However, the assessment carried out on milk from *B. bovis* positive animals showed an increase only on the levels of total solids, but we have to remember that a specific infection (mastitis) have different behavior of a systemic infection, investigated in our herd.

Animals *A. marginale* positives produced lower amounts of milk when compared to non-infected animals, as previously observed by other authors (16,17), as well as in cases of tick fever (18). This lower milk production can be easily explained by the anemia and hyperthermia caused by the intracellular bacteria, since milk production is related to the volume of blood that passes through the mammary gland. In Argentina, it has been reported that dairy cows experimentally infected by an attenuated strain of *A. marginale* showed reduction of milk production, as well as fever,

sanguíneo hacia el tejido mamario tras cambios en la permeabilidad capilar. La leche de vacas con infecciones intra-mamarias puede presentar un mayor número de células inmunes, lo que lleva a un predominio de neutrófilos, seguido por macrófagos y linfocitos, mientras que el número de células epiteliales permanece sin cambios (12, 13). Un estudio anterior mostró que la diarrea viral bovina afecta el valor de SCC (8); la falta de información respecto a las enfermedades infecciosas motivó el presente estudio sobre la relación entre la composición y calidad de la leche en el ganado lechero con fiebre por garrapatas.

Los niveles de lactosa en la leche de animales positivos por *B. bigemina* mostraron un incremento del 23%, lo que no coincide con los hallazgos de otros autores, quienes reportaron una disminución cuando estaban presentes la mastitis y un alto SCC (14). El aumento de lactosa evidenciado en el presente estudio fue inesperado porque, como se mencionó anteriormente, los contenidos de lactosa y grasa se ven afectados negativamente en los procesos inflamatorios. Además, la reducción de la producción de leche puede estar relacionada con los índices de carbohidratos consumidos por los animales, a pesar de recibir la misma dieta, y la ingesta puede variar entre animales.

El contenido total de sólidos tiene tendencia a disminuir (3-12%) con el aumento del SCC, lo que está relacionado principalmente con casos de mastitis (15). Sin embargo, la evaluación realizada a la leche de animales positivos al *B. bovis* mostró un aumento solamente en los niveles de sólidos totales, pero se debe recordar que una infección específica (mastitis) tiene un comportamiento diferente a una infección sistémica, investigada en nuestro rebaño.

Los animales positivos a *A. marginale* produjeron cantidades menores de leche al compararlos con animales no infectados, como lo observaron anteriormente otros autores (16,17), así como en casos de fiebre por garrapatas (18). Esta menor producción de leche se puede explicar fácilmente por la anemia e hipertermia causadas por la bacteria intracelular, ya que la producción de leche está relacionada con el volumen de sangre que pasa a través de la glándula mamaria. En Argentina se ha reportado que las vacas lecheras infectadas experimentalmente con una cepa atenuada de *A. marginale* mostraron reducción de la producción de leche, así como también fiebre, anorexia, adinamia, ictericia, y muerte de las más gravemente afectadas (16). En el presente estudio, los animales eran asintomáticos, pero aun así producían menores volúmenes de leche.

anorexia, adynamia, icterus, and death of the most severely affected (16). In the current study, animals were asymptomatic, but still produced lower volumes of milk.

Subclinical infection by agents of tick fever (*B. bovis*, *B. bigemina*, *A. marginale*) may affect milk quality, i.e. increase SCC due to stimulated immunity on infected animals. Lactose and total solids can also be increased in milk from *B. bigemina* and *B. bovis* positives cows. On the other hand, *A. marginale* negatively affects milk production.

La infección subclínica producida por agentes de la fiebre por garrapatas (*B. bovis*, *B. bigemina*, *A. marginale*) puede afectar la calidad de la leche, es decir aumenta el SCC debido a la inmunidad estimulada en los animales infectados. La lactosa y los sólidos totales también se pueden aumentar en la leche de vacas positivas a *B. bigemina* y *B. bovis*. Por otra parte, *A. marginale* afecta negativamente la producción de leche.

REFERENCES

1. Monteiro SG. Parasitologia Veterinária. São Paulo Brazil: Roca; 2010.
2. Almeida MB, Tortelli FP, Riet-Correa B, Ferreira JLM, Soares MP, Farias NAR, Riet-Correa F, Schild AL. Tick fever in southern Brazil: a retrospective study of 1978- Tick fever in southern Brazil: a retrospective study of 1978-2005. *Pesqui Vet Bras* 2006; 26(4):236-242.
3. Gonçalves RC, da Silva AA, Ferreira DOL, Chiacchio SB, Lopes RS, Borges AS, Amorim RA. Tristeza Parasitária em bovinos na região de Botucatu – SP: estudo retrospectivo de 1986 – 2007. *Semina: Ciências Agrárias* 2011; 32(1):307-312.
4. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol* 2010; 167(1):95-107.
5. Leitner G, Merin U, Silanikove N, Ezra E, Chaffer M, Gollop N, Winkler M, Glickman A, Saran A. Effect of subclinical intramammary infection on somatic cell counts, NAGase activity and gross composition of goats milk. *J Dairy Res* 2005; 71(3):311-315.
6. Ruegg PL, Pantoja JCF. Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality. *Irish J Agric Food Res* 2013; 52(2):101-117.
7. Beaudeau F, Fourichon C, Robert A, Joly A, Seegers H. Bulk milk somatic cell counts and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in dairy herds in Brittany (western France). *Prev Vet Med* 2005; 72(1-2):163-167.
8. Laureyns J, Piepers S, Ribbens S, Sarrazin S, De Vliegher S, Van Crombrugge JM, Dewulf J. Association between herd exposure to BVDV-infection and bulk milk somatic cell count of Flemish dairy farms. *Prev Vet Med* 2013; 109(1-2):148-151.
9. Suarez CE, Palmer CH, Jasmer DP. Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 46(1):45-52.
10. Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM. Detection of *Babesia bigemina* – infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol* 1992; 30(10):2576-2582.
11. Lew AE, Bock RE, Minchin CM, Masaka S. A msp1alpha polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Vet Microbiol* 2002; 86(4):325-335.
12. Cremonesi P, Capoferri R, Pisoni G, Del Corvo M, Strozzi F, Rupp R, Caillat H, Modesto P, Moroni P, Williams JL, Castiglioni B, Stella A. Response of the goat mammary gland to infection with *Staphylococcus aureus* revealed by gene expression profiling in milk somatic and white blood cells. *BMC Genomics* 2012; 13:540.
13. Brenaut P, Lefèvre L, Rau A, Laloë D, Pisoni G, Moroni P, Bevilacqua C, Martin P. Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. *Vet Res* 2014; 45:16.

14. Malek dos Reis CB, Barreiro JR, Mestieri L, Porcionato MA, dos Santos MV. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. *BMC Vet Res* 2013; 9:67.
15. Spaniol JS, Oltramari CE, Locatelli M., Volpato A, Campigotto G, Stefani SM, Da Silva AS. Influence of probiotic on somatic cell count in milk and immune system of dairy cows. *Comp Clin Path* 2015; 24(3):677-681.
16. Anziani OA, Hadani A, Ford CA, Guglielmone AA, Bermúdez AC, Mangold AJ, Suárez CM, Tarabla DH. Observaciones de campo y laboratorio sobre la inoculación de bovinos Holando Argentino con una cepa de *Anaplasma marginale*. *Gac Vet* 1981; 43(366):962-974.
17. Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmone AA, Meléndez RD. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbiol Rev* 2013; 16(4):698-712.
18. Stuen S, Solli Oppegaard A, Bergström K, Moum T. *Anaplasma phagocytophilum* Infection in North Norway. The First Laboratory Confirmed Case. *Acta Vet Scand* 2005; 46(1):167-171.