

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Tese

**Tristeza parasitária bovina: diagnóstico molecular, efeito sobre a fertilidade e desenvolvimento de um produto para prevenção**

**Natália Machado Rahal**

Pelotas, 2023

**Natália Machado Rahal**

**Tristeza parasitária bovina: diagnóstico molecular, efeito sobre a fertilidade e desenvolvimento de um produto para prevenção**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Marcio Nunes Corrêa  
Coorientadora: Josiane de Oliveira Feijó

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

R147t Rahal, Natália Machado

Tristeza parasitária bovina : diagnóstico molecular, efeito sobre a fertilidade e desenvolvimento de um produto para prevenção / Natália Machado Rahal ; Marcio Nunes Corrêa, orientador ; Josiane de Oliveira Feijó, coorientadora. — Pelotas, 2023.

103 f.

Tese (Doutorado) — Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Tristeza parasitária bovina. 2. qPCR. 3. Quantificação absoluta. 4. Liberação lenta. 5. Emulsão. I. Corrêa, Marcio Nunes, orient. II. Feijó, Josiane de Oliveira, coorient. III. Título.

CDD : 636.2089696

Natália Machado Rahal

Tristeza parasitária bovina: diagnóstico molecular, efeito sobre a fertilidade e desenvolvimento de um produto para prevenção

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/02/2023

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (Orientador)  
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Rovaina Laureano Doyle  
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Dr. Rubens Alves Pereira  
Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Elizabeth Schwegler  
Doutora em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

## **Agradecimentos**

Ao Marco, meu parceiro e companheiro de vida por todo o respeito, suporte e incentivo nesses últimos anos.

À minha família, de sangue e de coração, que sempre respeitaram e apoiaram meus sonhos e minhas rebeldias.

Ao meu orientador Marcio Nunes Corrêa, pelos ensinamentos, orientações e trocas de receitas culinárias.

À minha coorientadora e amiga Josiane de Oliveira Feijó, o caminho foi menos tortuoso por termos caminhado e crescido juntas, lado a lado.

Ao Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), todos os professores, graduandos, pós-graduandos e residentes do grupo, por todo o auxílio e vivência compartilhada ao longo desses quatro anos.

À UFPel e aos professores desta instituição, que forneceram a estrutura, suporte e aprendizado necessários para me desenvolver ainda mais como pessoa e profissional.

À professora Monique Tomazele Rovani, pela parceria e orientação na execução de um dos trabalhos que compõe essa tese.

A todos os demais profissionais e parceiros que nos apoiaram para a execução dos experimentos e projetos presentes nessa tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao Programa Centelha RS, e todos os órgãos de execução, parceria e realização, pelo financiamento parcial do projeto de inovação aqui apresentado.

Obrigada!

## Resumo

RAHAL, Natália Machado. **Tristeza parasitária bovina: diagnóstico molecular, efeito sobre a fertilidade e desenvolvimento de um produto para prevenção.** 2023. 105f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

*Anaplasma marginale* e *Babesia* spp. são parasitas, causadores de anemia hemolítica em bovinos e compõem o complexo de doenças tristeza parasitária bovina (TPB). A TPB é de caráter endêmico na maior parte do território brasileiro, gerando prejuízos econômicos significativos. O diagnóstico de maior sensibilidade é obtido através de técnicas moleculares. Portanto, o objetivo dessa tese foi compilar trabalhos sobre a ocorrência de *A. marginale* e *Babesia* spp., através de técnicas moleculares, no Brasil, verificar a influência destes parasitas sobre parâmetros hematológicos e taxa de concepção de novilhas Angus e desenvolver um veículo de liberação lenta e prolongada para prevenção da TPB. Inicialmente foi realizada uma revisão sistemática, com busca sobre estudos que utilizaram técnicas moleculares para detecção de *A. marginale* e *Babesia* spp. em bovinos no território brasileiro. Ao todo, 38 trabalhos foram incluídos na revisão, sendo a maior ocorrência de *A. marginale* e *B. bovis* encontradas no estado de Roraima (98,78% e 95,47%, respectivamente) e de *B. bigemina* no estado de São Paulo (86,25%). Para verificar o impacto da infecção por estes hemoparasitas na taxa de concepção, 94 novilhas Angus foram inseridas em protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Amostras de sangue foram coletadas no início do protocolo (D-10) e no dia do diagnóstico de gestação (D+34) para determinação de variáveis hematológicas. Uma alíquota de sangue do D-10 foi utilizada para extração de DNA genômico total (gDNA) e todas as amostras foram submetidas a PCR quantitativa (qPCR) para investigação de genes alvo para *A. marginale* e *B. bovis*. Todas as amostras positivas para *B. bovis* foram submetidas a quantificação absoluta, determinando número de cópias (CN) de *B. bigemina* e *B. bovis*. Foram realizadas comparações entre os grupos prenhes (P) e não prenhes (NP) e correlação entre o CN e parâmetros hematológicos. A taxa de concepção ao primeiro serviço foi 47,87% (45/94), somente no D-10 o NP apresentou hemoglobina maior que o P. Todas as novilhas foram positivas para *A. marginale* e *B. bovis* na qPCR, enquanto na quantificação absoluta, seis novilhas foram negativas para *B. bigemina* (quatro P e duas NP) e duas negativas para *B. bovis*, uma de cada grupo. Não houve diferença com relação CN e correlação significativa foi encontrada apenas entre hemoglobina/eritrócito ( $P < 0,0001$ ;  $r = 0,8082$ ) e hemoglobina/hematócrito ( $P = 0,0049$ ;  $r = 0,3009$ ), respectivamente. Para estratégia inovadora para prevenção da TPB, foi desenvolvida uma emulsão de liberação lenta e sustentada, realizando testes de liberação *in vitro*, e comparando com formulação comercial, e teste para verificar dor e/ou reações no local de aplicação. Nos testes *in vitro*, as liberações ocorreram de forma mais lenta quando comparadas ao produto comercial. Já no teste

com animais, foi notado aumento de volume no local de aplicação, sem manifestações de dor significativa. Conclui-se que, a ocorrência de *A. marginale* e *Babesia* spp. variou de 7,32% a 98,78% e, apesar da quantidade de dados encontrados sobre a ocorrência e uso de diagnóstico molecular, ainda há lacunas e oportunidades de pesquisa, principalmente sobre a quantificação de perdas nos rebanhos de maior ocorrência de TPB, e para o desenvolvimento de formulações para prevenção destas doenças.

**Palavras-chave:** tristeza parasitária bovina; qPCR; quantificação absoluta; liberação lenta; emulsão

## Abstract

RAHAL, Natália Machado. **Effect *Anaplasma marginale* and *Babesia* spp. infection in taurine heifers' fertility and development of emulsion for cattle tick fever prevention.** 2023. 105f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

*Anaplasma marginale* and *Babesia* spp. are parasites that cause hemolytic anemia in cattle and make up the cattle tick fever complex (TF). Tick fever is endemic in most of the Brazilian territory, causing significant economic losses. The most sensitive diagnosis is obtained through molecular techniques. Therefore, the objective of this thesis was to determine the occurrence of *A. marginale* and *Babesia* spp., using molecular diagnostic, in Brazil, to verify the influence of these parasites on hematological parameters and conception rate of Angus heifers, and to develop a slow and prolonged release vehicle for TF prevention. Initially, a systematic review was carried out, with a search for studies that used molecular techniques to detect *A. marginale* and *Babesia* spp. in cattle in the Brazilian territory. Overall, 38 studies were included in the review, with the highest occurrence of *A. marginale* and *B. bovis* found in the state of Roraima (98.78% and 95.47%, respectively) and *B. bigemina* in the state of São Paulo (86.25%). To verify the impact of infection by these hemoparasites on the conception rate, 94 Angus heifers were inserted into a timed artificial insemination (TAI) protocol. Blood samples were collected at the beginning of the protocol (D-10) and on the day of pregnancy diagnosis (D+34) to determine hematological variables. An aliquot of D-10 blood was used for total genomic DNA (gDNA) extraction and all samples were subjected to quantitative PCR (qPCR) to investigate target genes for *A. marginale* and *B. bovis*. All positive samples for *B. bovis* were submitted to absolute quantification, determining copy number (CN) of *B. bigemina* and *B. bovis*. Comparisons were made between pregnant (P) and non-pregnant (NP) groups and correlation between CN and hematological parameters. The conception rate at the first service was 47.87% (45/94), only on D-10 the NP had higher hemoglobin than the P. All heifers were positive for *A. marginale* and *B. bovis* in qPCR, while in absolute quantification, six heifers were negative for *B. bigemina* (four P and two NP) and two negatives for *B. bovis*, one from each group. There was no difference with CN ratio and significant correlation was found only between hemoglobin/erythrocyte ( $P < 0.0001$ ;  $r = 0.8082$ ) and hemoglobin/hematocrit ( $P = 0.0049$ ;  $r = 0.3009$ ), respectively. For an innovative strategy for the prevention of TF, a slow and sustained release emulsion was developed, performing *in vitro* release tests, and comparing it with a commercial formulation, and testing to verify pain and/or reactions at the application site. In *in vitro* tests, emulsions releases occurred more slowly when compared to the commercial product. In the test with animals, an increase in volume at the application site was noted, without manifestations of significant pain. It is concluded that the occurrence of *A. marginale* and *Babesia* spp. ranged from 7.32% to 98.78% and, despite the amount

of data found on the occurrence and use of molecular diagnosis, there are still gaps and research opportunities, mainly on the quantification of losses in the herds with higher occurrence of TF, and for the development of formulations for the prevention of these diseases.

**Keywords:** cattle tick fever; qPCR; absolute quantification; slow release; emulsion

## Lista de Figuras

### ARTIGO 1

- Figura 1 Diagrama PRISMA 2020 para identificação e seleção de registros para a revisão sistemática sobre diagnóstico molecular da tristeza parasitária bovina no Brasil..... 24
- Figura 2 Ocorrência (%) de animais infectados com *Anaplasma marginale* em rebanhos bovinos no Brasil, de acordo com estudos que utilizaram métodos moleculares para diagnóstico. O mapa foi criado utilizando o software QGIS..... 30
- Figura 3 Ocorrência (%) de animais infectados com *Babesia bigemina* em rebanhos bovinos no Brasil, de acordo com estudos que utilizaram métodos moleculares para diagnóstico. O mapa foi criado utilizando o software QGIS..... 31
- Figura 4 Ocorrência (%) de animais infectados com *Babesia* spp. e *Babesia bigemina* em rebanhos bovinos no Brasil, de acordo com estudos que utilizaram métodos moleculares para diagnóstico. O mapa foi criado utilizando o software QGIS..... 32

### ARTIGO 2

- Figure 1 Hematological parameters of angus heifers with pregnant (PG) and non-pregnant (NPG) on the first day (D-10) and 34 days after the timed artificial insemination protocol (TAI). Hematocrit observed in D-10 (A) and D+34 (B), total plasma protein in D-10 (C) and D+34 (D), number of erythrocytes in D-10 (E) and D+34 (F) and hemoglobin concentration in D-10 (G) and D+34 (H)..... 66

## PATENTE

Figura 1	Percentual acumulado de liberação em teste in vitro realizado com formulação comercial e emulsões com diferentes excipientes e concentrações de Sal 1.....	86
Figura 2	Escore de aumento de volume no local de aplicação de vacas submetidas ou não à aplicação de emulsão para prevenção da tristeza parasitária bovina.....	87
Figura 3	Percentual acumulado de liberação de Sal 2 em teste in vitro realizado com emulsão com contendo diferentes proporções de Excipientes.....	88

## Lista de Tabelas

### ARTIGO 1

Tabela 1	Tipo de estudos realizados no Brasil para investigar a ocorrência de <i>Anaplasma marginale</i> em bovinos utilizando métodos moleculares.....	25
Tabela 2	Quantificação absoluta de cópias de DNA para genes de <i>A. marginale</i> , segundo metodologia de estudos realizados no Brasil...	26
Tabela 3	Tipo de estudos realizados no Brasil para investigar a ocorrência de <i>Babesia bigemina</i> em bovinos utilizando métodos moleculares..	27
Tabela 4	Quantificação absoluta de cópias de DNA para genes de <i>B. bigemina</i> , segundo metodologia de estudos realizados no Brasil.....	27
Tabela 5	Tipo de estudos realizados no Brasil para investigar a ocorrência de <i>Babesia</i> spp. e <i>B. bovis</i> em bovinos utilizando métodos moleculares.....	28
Tabela 6	Quantificação absoluta de cópias de DNA para genes de <i>Babesia</i> spp. e <i>B. bovis</i> , segundo metodologia de estudos realizados no Brasil.....	29

### ARTIGO 2

Table 1	Primers and probes used for qPCR for absolute quantification of <i>Babesia bigemina</i> and <i>B. bovis</i> .....	65
Table 2	Number of DNA copies (NC) of <i>Babesia bigemina</i> and <i>B. bovis</i> (mean $\pm$ SE) of pregnant (PG) and non-pregnant (NPG) Aberdeen Angus heifers on the first day (D-10) of fixed timed artificial insemination protocol.....	67

Table 3	Correlation matrix of hematological parameters and number of <i>Babesia bigemina</i> and <i>B. bovis</i> copies of Aberdeen Angus heifers before timed artificial insemination.....	68
---------	---	----

### PATENTE

Tabela 1	Emulsões (volume final de 20 mL) com inclusão de Sal 1.....	76
Tabela 2	Composição da emulsão aplicada em vacas da raça Holandês e Jersey.....	78
Tabela 3	Variáveis clínicas de vacas submetidas ou não à aplicação de emulsão para prevenção da tristeza parasitária bovina.....	80
Tabela 4	Concentração de Sal 1 em soro sanguíneo pela técnica de LC-MS/MS.....	80
Tabela 5	Emulsões (volume final de 20 mL) com inclusão de Sal 2, diferentes proporções de Excipientes e Surfactante 2.....	81

## Lista de Abreviaturas e Siglas

TPB	Tristeza parasitária bovina
TF	<i>Tick fever</i>
<i>msp</i>	<i>Major surface protein</i>
gDNA	<i>Genomic DNA</i>
TAI	<i>Timed artificial insemination</i>
CN	Número de cópias ( <i>Copy number</i> )
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
<i>18SrRNA</i>	<i>18S ribossomic RNA</i>
<i>mt-cyB</i>	<i>Mitochondrial cytochrome B</i>
<i>sbp</i>	<i>Spherical body protein</i>
<i>msa</i>	<i>Merozoite surface protein</i>
<i>rap</i>	<i>Rhoptry-associated protein</i>
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
HRM	<i>High resolution melting</i>
qPCR	<i>Quantitative PCR</i>
nPCR	<i>Nested PCR</i>
snPCR	<i>Semi-nested PCR</i>
BCS	<i>Body condition score</i>
EB	<i>Estradiol benzoate</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
SQ	<i>Starting quantity</i>
MIQE	<i>Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments</i>

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>14</b>
<b>2 Artigos.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Artigo 1.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Artigo 2.....</b>	<b>53</b>
<b>3 Patente.....</b>	<b>70</b>
<b>4 Considerações Finais.....</b>	<b>90</b>
<b>Referências.....</b>	<b>91</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>101</b>

## 1 Introdução

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um complexo de enfermidades infecciosas, babesiose e anaplasmose, causada por agentes intraeritrocitários que causam anemia hemolítica em seus hospedeiros (*Babesia* spp. e *Anaplasma marginale*). A TPB representa aproximadamente 55% das enfermidades parasitárias em bovinos no Rio Grande do Sul (OLIVEIRA et al., 2017) e a transmissão ocorre, principalmente, pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* (carrapato do boi), presente em quase todo o território brasileiro. Entretanto, além do carrapato, a transmissão também pode ocorrer pela ação de moscas hematófagas e materiais contaminados com sangue de animais infectados, tais como seringas e agulhas (KOCAN et al., 2010; PALMER; CLOTHIER, 2015; ZAUGG, 2015).

A maior parte do território brasileiro é caracterizado como área de estabilidade enzoótica, onde a maioria dos animais tem contato com agentes da TPB nos primeiros meses de vida e há menor ocorrência de surtos. Já em áreas como o sertão nordestino e algumas regiões do Rio Grande do Sul (próximas ao paralelo 32°S), as alterações climáticas extremas interferem no ciclo do carrapato e os bovinos nem sempre são desafiados no início da vida, havendo alto risco de surtos. Também, no sul do Rio Grande do Sul há áreas livres da ocorrência do *R. microplus*, sendo que rebanhos nessa região ficam mais susceptíveis a ocorrência de surtos clínicos por *A. marginale* e *Babesia* spp. (SANTOS et al., 2019).

No Brasil, considerando diferentes métodos diagnósticos, foram constatadas prevalência de 36,6% para *A. marginale*, 62,6% de *Babesia* spp. e 8,2% de casos de coinfeção em 2019 (FERREIRA et al., 2022). Esses dados indicam que grande quantidade de animais pode estar em risco, pois caso o sistema imunológico do hospedeiro seja comprometido, como em situações estressantes, os agentes podem se reproduzir e causar um quadro clínico (KOCAN et al., 2010). Com as variações da prevalência e taxa de infecção dos agentes da TPB em rebanhos bovinos, a presença de animais reservatório garante a persistência dos agentes etiológicos e transmissão destes à prole (BRITO et al., 2019). Com as fêmeas bovinas, a imunossupressão transitória durante o periparto pode levar ao surgimento de reinfecções e recidivas por

parte das vacas e susceptibilidade do feto às infecções por *A. marginale* (SILVA; FONSECA, 2014). Caso isso ocorra, os órgãos dos fetos podem ser diretamente afetados, causando esplenomegalia, hemorragias e danos neurológicos resultando em aborto, parto de natimortos ou bezerros doentes que morrerão no primeiro mês de vida como consequência da infecção por hemoparasitas (COSTA et al., 2016; HENKER et al., 2020).

Os prejuízos decorrentes dessa doença podem ser diretos (gastos com manejo e medicamentos, para prevenção e tratamento, e pela morte de animais doentes) ou indiretos (menor ganho de peso, menor produção de leite etc.). A utilização racional de protocolos de tratamento somente quando os animais são diagnosticados com TPB (monitoramento de temperatura retal e análise de esfregaço sanguíneo), pode auxiliar produtores a economizarem aproximadamente 22,6 mil dólares por ano (SOUZA et al., 2021). Enquanto, ao se considerar somente a morte de bovinos em decorrência da TPB, os prejuízos no sul do Brasil foram estimados em aproximadamente 10 milhões de reais por ano (OLIVEIRA et al., 2017).

Para diagnóstico da TPB a técnica de esfregaço sanguíneo geralmente permite a visualização de *Babesia* spp. e *A. marginale* dentro dos eritrócitos em animais em fase aguda (picos de parasitemia). Entretanto, esta técnica apresenta baixa sensibilidade em detectar animais reservatório ou animais em estágio inicial das doenças. Além disso, os corantes utilizados nesta técnica frequentemente geram artefatos, fornecendo resultados falso-positivos (AL-HOSARY, 2017). Como alternativa, através do uso de técnicas moleculares é possível identificar com precisão quais agentes estão causando os sinais clínicos e, com o avanço de métodos quantitativos, se determinar o nível de infecção (RAMOS et al., 2011).

Para o tratamento clínico das doenças, são utilizados princípios ativos como oxitetraciclina, aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb. Ainda, pode-se utilizar enrofloxacina no tratamento da anaplasmoze, além de toda terapia de suporte necessária para o restabelecimento dos animais, incluindo transfusão sanguínea em casos mais críticos (FARIAS, 2007; OLIVEIRA; FREITAS, 2015). Devido à complexidade dos parasitas envolvidos na TPB, o avanço de novos medicamentos para prevenção e tratamento segue de forma lenta. O tratamento atual muitas vezes depende tanto da combinação de princípios ativos, quanto da aplicação de diversas doses de um mesmo medicamento (revisado por GOHIL et al., 2013). Com o intuito de se obter efeito de longa duração, a associação da oxitetraciclina a excipiente

viscoso, como a 2-pirrolidona, é utilizada em formulações comerciais, possibilitando aumento da meia-vida de 9,12 para 21,8 horas (PAPICH; RIVIERE, 2018).

O dipropionato de imidocarb é adequado para o tratamento preventivo e terapêutico da babesiose em bovinos, equinos e cães e para a anaplasnose em bovinos. Devido ao prolongado período de incubação na anaplasnose, a utilização do dipropionato de imidocarb antes do aparecimento da doença poderá ser prematura, impossibilitando o desenvolvimento da proteção após a infecção causada pelos carrapatos (KESSLER; SCHENK, 1998; FARIAS, 2007). Ainda, a utilização desse princípio nas doses recomendadas e com o número de aplicações necessárias pode apresentar efeitos adversos nos animais, tais como diarreia, inflamação excessiva no local de aplicação, apresentando também alto potencial de toxicidade (MOSQUEDA et al., 2012).

A quimioprofilaxia é um dos métodos utilizados no controle da TPB e é aplicada de acordo com a situação epidemiológica do rebanho e com a circulação de animais nas propriedades rurais. Consiste na aplicação de doses sub-terapêuticas de quimioterápicos como tetraciclina, diacetato de diminazeno e dipropionato de imidocarb. Desse modo, utilizando doses abaixo do recomendado para o tratamento da doença clínica, permite-se que os animais tenham os sinais clínicos amenizados ao entrarem em contato com os agentes etiológicos da TPB, sendo capazes de desenvolver uma resposta imunológica adequada (VOS, 1992). A utilização de quimioprofilaxia em novilhos sem sinais clínicos evidentes ao início do estudo apresentou resultados positivos no ganho de peso, se mostrando uma ferramenta de melhoria de desempenho em categorias jovens de bovinos destinados ao abate (SILVA et al., 2015).

Apesar da diversidade de estudos, ainda são escassas as informações acerca da ocorrência da infecção por *A. marginale* e *Babesia* spp. em rebanhos no território brasileiro, principalmente associando a influência destes em parâmetros produtivos e reprodutivos de animais persistentemente infectados. Também, há oportunidades no mercado farmacêutico veterinário para o desenvolvimento de veículos com característica de liberação inicialmente controlada e sustentada, havendo a possibilidade de associar aos princípios ativos já utilizados contra *A. marginale* e *Babesia* spp. Algumas vantagens da utilização de produtos de longa ação contra a TPB pode trazer aos produtores são: fornecimento de suporte por maior tempo, minimizando os efeitos da babesiose e anaplasnose em animais susceptíveis

(primeiro contato com os agentes ou situações estressantes); menor risco de intoxicação, pelo controle do pico inicial de liberação; e, necessidade de menor número de aplicações, pela maior biodisponibilidade.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo geral

Compilar estudos para analisar a ocorrência de *A. marginale* e *Babesia* spp., através de técnicas moleculares, no Brasil, verificar a influência destes parasitas sobre fertilidade de novilhas Angus e desenvolver um produto de liberação lenta para prevenção da TPB.

### 1.2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos dessa tese foram:

- i. Realizar uma revisão sistemática sobre estudos conduzidos no Brasil utilizando técnicas moleculares para diagnóstico de *A. marginale* e *Babesia* spp. em bovinos;
- ii. Determinar a ocorrência de *A. marginale* e *Babesia* spp. nos estados brasileiros;
- iii. Determinar a influência da infecção natural por *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* na taxa de concepção ao primeiro serviço de novilhas *Bos taurus*;
- iv. Determinar a influência da parasitemia de *Babesia* spp. na taxa de concepção ao primeiro serviço e nos valores de hematócrito, número de eritrócitos, hemoglobina e proteínas plasmáticas totais de novilhas *Bos taurus*;
- v. Correlacionar o número de cópias de DNA de *Babesia* spp. com as variáveis hematológicas de novilhas *Bos taurus*.
- vi. Desenvolver e testar uma emulsão para liberação lenta e prolongada de sais para prevenção da tristeza parasitária bovina.

## **2 Artigos**

### **2.1 Artigo 1**

#### **Diagnóstico molecular da tristeza parasitária bovina no Brasil: revisão sistemática, ocorrência e oportunidades futuras**

Natália Machado Rahal, Kauê Rodriguez Martins, Josiane de Oliveira Feijó, Marco Antonio Tonus Marinho, Marcio Nunes Corrêa

Será submetido à revista *Ciência Animal Brasileira*

## Revisão sistemática sobre diagnóstico molecular da tristeza parasitária bovina no Brasil: ocorrência e oportunidades futuras

### Systematic review on molecular diagnosis of cattle tick fever in Brazil: occurrence and future opportunities

#### RESUMO

A bovinocultura brasileira enfrenta diversos desafios, dentre esses, as doenças transmitidas por vetores geram prejuízos significativos pela ampla disseminação no país. As técnicas moleculares são mais sensíveis na identificação de animais persistentemente infectados. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi compilar dados referentes à ocorrência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis*, causadores da tristeza parasitária bovina (TPB), detectados por técnicas moleculares, identificando lacunas e oportunidades para futuras pesquisas no Brasil. Para isso, foi conduzida uma revisão sistemática, onde os principais critérios de inclusão foram: estudos realizados com amostras do Brasil; utilização de amostras de bovinos naturalmente infectados; dados exatos sobre número ou percentual de animais positivos; número de amostras por rebanho  $\geq 10$ ; e informação, pelo menos, do estado de origem das amostras. Ao todo, 38 estudos foram incluídos na revisão, sendo utilizadas técnicas de PCR convencional (multiplex PCR, PCR, nPCR e snPCR) e PCR quantitativa e semiquantitativa (qPCR e HRM). As faixas de ocorrência para as espécies foram: 35 a 98,78% para *A. marginale*; 8,19 a 86,25% para *B. bigemina*; e de 7,32 a 95,47% para *B. bovis*. Os maiores percentuais de ocorrência para *A. marginale* e *B. bovis* foram no estado de RO, e para *B. bigemina* foi no estado de SP. Apesar da quantidade de dados encontrados, ainda são evidentes inúmeras oportunidades de direcionamento para futuras pesquisas, principalmente no que diz respeito ao uso de técnicas moleculares e quantificação das perdas nos rebanhos de maior ocorrência da TPB.

**Palavras-chave:** PCR; Bovinos; Quantificação absoluta; Anaplasmoze; Babesiose

#### ABSTRACT

Brazilian cattle raising faces several challenges, among these, vector-borne diseases generate significant losses due to the widespread in the country. Molecular techniques are more sensitive in the identification of persistently infected animals. Thus, the objective of this work was to compile data regarding the occurrence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis*, causing cattle tick fever (TF), only detected by molecular techniques, identifying gaps and opportunities for future research in Brazil. For this, a systematic review was conducted, where the main inclusion criteria were: studies conducted with samples from Brazil; use of samples of naturally infected bovine animals; accurate data on the number or percentage of positive animals; number of samples per herd  $\geq 10$ ; and information on at least the state of origin of the samples. In all, 38 studies were included in the review, using conventional PCR techniques (multiplex PCR, PCR, nPCR and snPCR) and quantitative or semiquantitative PCR (qPCR and HRM). The occurrence ranges were: 35 to 98.78% for *A. marginale*; 8.19 to 86.25% for *B. bigemina*; and from 7.32 to 95.47% for *B. bovis*. The highest percentages of occurrence for *A. marginale* and *B. bovis* were in the state of RO, and for *B. bigemina* it was in the state of SP. Despite the amount of data found, there are still numerous opportunities for guidance for future research, especially regarding the use of molecular techniques and quantification of losses in the herds with higher occurrence of TF.

#### 1. Introdução

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com 224,6 milhões de animais, apresentando crescente produtividade pecuária <sup>(1)</sup> e proporcionando emprego para quase dois milhões de trabalhadores <sup>(2)</sup>. Um dos principais desafios econômicos na bovinocultura, do Brasil e do mundo, são as doenças transmitidas por vetores <sup>(3-7)</sup>. A rickettsia *Anaplasma marginale* e os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, são parasitas intraeritrocitários que comumente infectam bovinos causando um complexo de doenças denominado tristeza parasitária bovina (TPB) e podem apresentar sinais clínicos como anemia hemolítica, febre, aborto, natimortos, perda de peso e redução da produção de leite <sup>(3, 4, 8)</sup>. Em levantamento acerca de mortes devido a doenças parasitárias no estado do Rio Grande do Sul, os prejuízos por perdas relacionadas a TPB foram quantificados em aproximadamente 10 milhões de reais por ano <sup>(4)</sup>.

A incidência de babesiose e anaplasmoze bovina nos rebanhos está associada à presença de seus vetores específicos, o carrapato *Rhipicephalus microplus* e moscas hematófagas, tais como *Haematobia irritans* e *Stomoxys calcitrans* <sup>(9)</sup>. Particularmente, em relação à ocorrência de carrapatos, o território brasileiro possui três áreas de distribuição geográfica distintas entre os paralelos 32°N e 32°S, que representam três *status* epidemiológicos diferentes para a babesiose. Entre os paralelos 32°N e 32°S, há uma zona de estabilidade epidemiológica, na qual se localiza a maioria dos estados brasileiros. As cidades/regiões localizadas no paralelo 32°S são consideradas de instabilidade enzoótica, onde durante o inverno a população de carrapatos e moscas é reduzida ou ausente. O paralelo abaixo de 32°S, na região sul do Estado do Rio Grande do Sul, é categorizado como zona livre, devido às condições climáticas <sup>(10)</sup>. Recentemente, uma revisão mostrou prevalência de 36,6% para *A. marginale* e 62,6% para *Babesia* spp. no Brasil, considerando todos os métodos diagnósticos e fornecendo dados de ocorrência de acordo com as regiões do país. Porém, devido a diferenças na sensibilidade e especificidade dos testes, bem como nos níveis de parasitemia, há variabilidade nos resultados <sup>(11)</sup>.

Devido à capacidade dos patógenos de evasão ao sistema imunológico do hospedeiro, o tratamento nem sempre fornece eliminação completa destes e os animais podem se tornar persistentemente infectados (reservatórios) e os parasitas permanecem em estágio latente nas células bovinas <sup>(12, 13)</sup>. Em situações estressantes, como transporte, alta densidade populacional e periparto, os níveis de parasitemia podem subir novamente e a doença aguda pode ocorrer <sup>(14)</sup>.

A identificação de animais persistentemente infectados é importante para a tomada de decisões estratégicas visando minimizar perdas no rebanho, pois estes servem como fonte de infecção para carrapatos e animais *naïve*, especialmente em áreas de instabilidade enzoótica <sup>(10)</sup>.

<sup>15</sup>). A ferramenta diagnóstica mais simples e economicamente viável para a TPB, complexo que envolve um ou mais agentes, é a visualização microscópica direta de parasitas através de esfregaços de sangue total ou periférico. No entanto, este é um teste de baixa sensibilidade, sendo essencial um avaliador bem treinado para sua execução. Além disso, os animais portadores geralmente apresentam baixos níveis de parasitemia, não sendo possível nestes casos visualização dos agentes infecciosos por meio dessa técnica <sup>(15, 16)</sup>.

Outra opção possível para diagnóstico é a sorologia, técnica realizada para avaliar a resposta imune humoral contra TPB em investigações epidemiológicas (maior número de amostras) ou para rastrear a exposição individual e do rebanho <sup>(15)</sup>. Porém, para se obter maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico das infecções por *A. marginale* e *Babesia* spp., as técnicas moleculares são as melhores opções, principalmente na identificação de animais persistentemente infectados. Diferentes genes-alvo e técnicas têm sido utilizados ao longo do tempo e em todo o mundo em busca de um teste padrão-ouro <sup>(15, 17–20)</sup>.

Devido aos avanços com a detecção direta, sendo capaz não apenas de prever se há uma infecção, mas também quantificá-la, nesta revisão objetivou-se compilar dados referentes à presença de *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* em rebanhos bovinos, detectados apenas por técnicas moleculares, bem como identificar lacunas e oportunidades para futuras pesquisas no Brasil.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Protocolo de busca

Para o protocolo desta revisão foi seguido o checklist PRISMA 2020 <sup>(21)</sup>. Para a inclusão, os artigos deveriam ser publicados utilizando dados provenientes de amostras coletadas de bovinos (*Bos taurus* e/ou *Bos indicus*) em qualquer estado do território brasileiro, de animais naturalmente infectados. Foram incluídos apenas os artigos em que foram utilizadas técnicas moleculares para os diagnósticos de *Anaplasma* spp. e *Babesia* spp. Não foram incluídas dissertações, teses e resumos publicados em anais, assim como artigos focados exclusivamente em filogenética ou que relataram apenas diagnóstico baseado em esfregaço sanguíneo e/ou sorologia. Outros critérios de exclusão foram baixo número de amostras ( $n \leq 10$ ) e delineamentos que incluíssem apenas infecção experimental.

Para pesquisa bibliográfica, nosso procedimento em bases de dados internacionais (PubMed e Scopus) envolveu as seguintes palavras-chave: ("*Anaplasma marginale*" OR "*Anaplasma centrale*" OR "*Babesia bovis*" OR "*Babesia bigemina*" OR "Cattle tick fever" OR "Bovine tick sadness") AND (Cattle OR Bovine OR "*Bos taurus*" OR "*Bos indicus*") AND ("Molecular diagnos\*" OR "\*PCR" OR "blotting") AND "Brazil". A busca também foi

realizada utilizando essas mesmas palavras-chave em inglês e português no Google Acadêmico (<https://scholar.google.com.br/>). Inicialmente, títulos e resumos foram avaliados e artigos duplicados, conduzidos somente com amostras de outros países e/ou não publicados em periódicos revisados por pares foram excluídos. Posteriormente, a seção de material e métodos foi selecionada e os artigos que não atendiam aos critérios foram excluídos. Para serem incluídos, os registros tinham que conter, pelo menos, o local de amostragem (estado), o método molecular, o gene alvo e/ou a sequência de nucleotídeos (ou fornecer referência) e o número exato ou a frequência de animais positivos. Todas as buscas foram realizadas no período de abril a agosto de 2022.

Dois revisores estiveram envolvidos no processo de busca e selecionaram os registros elegíveis de forma independente. Para o processo de coleta de dados, informações pré-definidas foram conferidas em cada artigo incluído na revisão pelo menos três vezes. Os artigos que atendiam a todos os critérios foram importados para o software Zotero <sup>(22)</sup>. Quando detectadas semelhanças sobre amostragem (cidade/região, número de animais e raça), os autores correspondentes de cada artigo foram contatados para esclarecer se as amostras haviam sido utilizadas em mais de um artigo publicado.

## **2.2. Análise dos dados**

Os dados obtidos foram armazenados em planilha eletrônica Excel <sup>(23)</sup>, incluindo: período do estudo; cidade/região e estado; coordenadas geográficas; número de animais do rebanho; raça ou espécie; número de animais utilizados no estudo; idade; sexo; tipo de sistema de produção; agente infeccioso investigado; gene alvo; sequência de nucleotídeos; método molecular; número de animais positivos; outro(s) método(s) de diagnóstico; número de animais sintomáticos; tipo de amostra utilizada; número de animais que morreram devido à anaplasmose e/ou babesiose; avaliação *post mortem*; tratamento (sintomático ou profilático na propriedade); e coinfeções com mais de um agente da tristeza parasitária bovina (Arquivo Suplementar 1 – *Planilha com os dados extraídos*).

Com base no objetivo dos artigos e na seção de material e métodos, os tipos de estudos foram categorizados em: (i) Influência da raça (TPB); (ii) Epidemiologia (prevalência); (iii) Caracterização genética; (iv) Caracterização genética (epidemiologia); (v) Caracterização genética (longitudinal); (vi) Caracterização genética (surto); (vii) Diversidade genética; (viii) Estudo longitudinal; (ix) Comparação entre métodos; (x) Investigação de surtos; (xi) Relação entre carrapatos e TPB; e (xii) Avaliação da eficácia de tratamento. Os dados foram compilados em tabelas de acordo com o agente infeccioso.

Para a análise dos dados de ocorrência, apenas um dos artigos que utilizaram as mesmas amostras foi incluído, priorizando os artigos que utilizaram maior tamanho amostral e/ou método molecular mais sensível. Para a ocorrência de animais positivos em estudos longitudinais, utilizou-se a média fornecida nos trabalhos, ou foi calculada dividindo-se o número total de amostras positivas pelo número total de amostras analisadas, independentemente do período amostral. A partir de estudos que utilizaram mais de um método molecular, os dados de frequência foram obtidos daquele com maior especificidade e/ou sensibilidade. Em estudos onde foram realizados tratamentos dos animais, utilizou-se somente os resultados antes do tratamento. Já para estudos onde foram avaliadas infecções naturais e experimentalmente induzidas (por carrapatos ou inoculações diretas), somente dados de animais naturalmente infectados foram considerados. Para confecção dos mapas, estudos foram categorizados em quatro grupos, de acordo com o tamanho amostral: A – 10 a 50 animais; B – 51 a 100; C – 101 a 200; e D – 201 a 400. A ocorrência foi calculada dividindo o número de animais positivos pelo número de animais avaliados, multiplicando o resultado por 100. Os rebanhos foram categorizados em quatro grupos de acordo com o percentual de animais positivos: 1 –  $\leq 25\%$ ; 2 –  $>25\%$  e  $\leq 50\%$ ; 3 –  $>50\%$  e  $\leq 75\%$ ; e 4 –  $>75\%$ .

No mapa de ocorrência de *B. bovis* também foram incluídos dados de estudos que utilizaram primers para *Babesia* spp. Foram criados mapas categorizando cada estado brasileiro de acordo com as frequências obtidas para cada agente infeccioso, identificando coordenadas geográficas e tamanho amostral dos rebanhos utilizando o software QGIS <sup>(24)</sup>.

### 3. Resultados

#### 3.1. Características dos estudos

Duzentos e noventa e oito estudos foram identificados por meio de bases de dados e, após a triagem inicial do título e resumos, apenas 76 artigos tiveram a seção de material e métodos avaliados. Destes, 49 foram avaliados quanto à elegibilidade e 38 foram incluídos na revisão (Figura 1). Nenhum dos trabalhos incluiu diagnóstico para *A. centrale* nem utilizou técnicas de *blotting*. Os estudos incluídos foram realizados de 2000 a 2019 e publicados de 2005 a 2022.

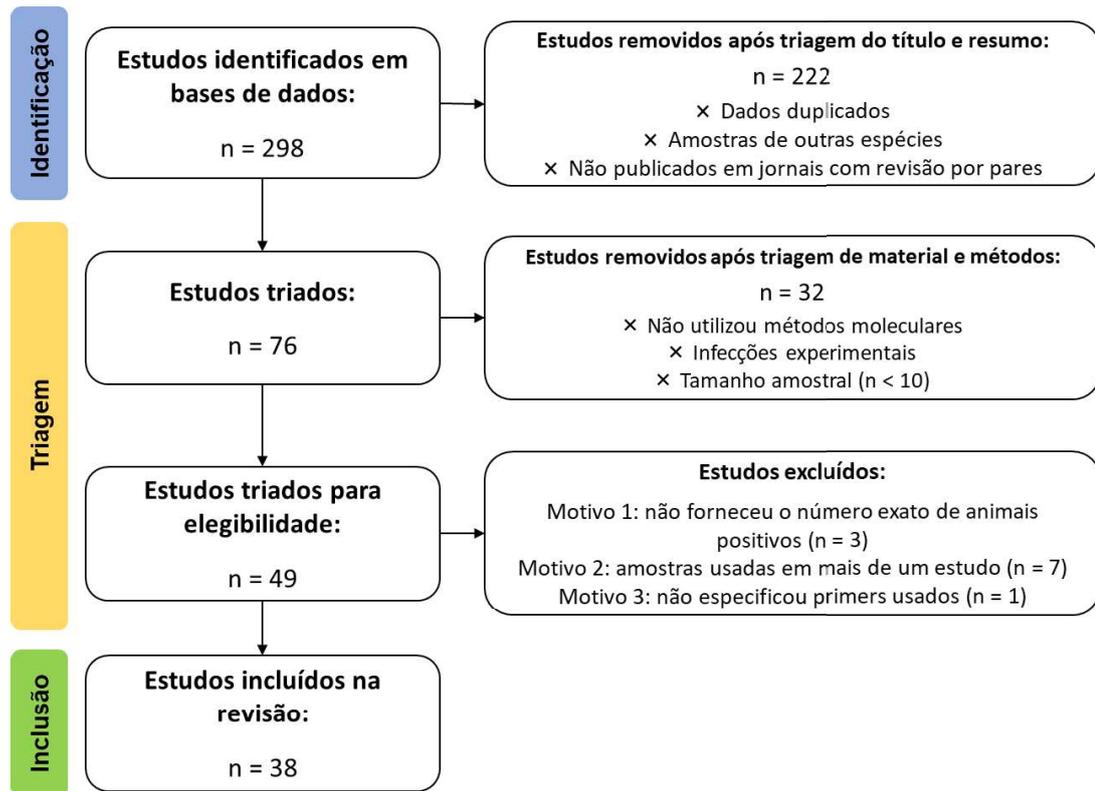


Figura 1. Diagrama PRISMA 2020 para identificação e seleção de registros para a revisão sistemática sobre diagnóstico molecular da tristeza parasitária bovina no Brasil

Os artigos selecionados forneceram informações de 6.282 animais (72 rebanhos), com idade variando desde o nascimento até os 9 anos. Em relação aos agentes infecciosos, em maior número de amostras foi investigada a ocorrência de *A. marginale* (n = 4.648 animais), seguido por *B. bovis* (n = 2.164), *B. bigemina* (n = 3.647) e *Babesia* spp. (n = 45). A maioria dos animais avaliados eram mestiços de raça leiteira (n = 2.272), seguidos por raças taurinas (Aberdeen Angus, Crioula Lageana, Limousin, Charolais e Nelore; n = 977), cruzamentos de raças taurinas (n = 362) e dois rebanhos de bovinos Holandês (n = 80). Com relação aos sistemas de criação, 1.105 estavam em sistema extensivo, 135 em semi-intensivo e apenas 15 em sistema intensivo.

Em relação ao tipo de amostra, dois estudos epidemiológicos que investigaram a infecção por *A. marginale* e *B. bovis* em rebanhos bovinos no sudoeste da Amazônia utilizaram coágulos sanguíneos para extração de DNA. Os coágulos foram fornecidos pelo serviço veterinário oficial, responsável pelo monitoramento de doenças bovinas nos estados de Rondônia e Acre. Os demais estudos utilizaram amostras de sangue total, coletadas em tubos contendo anticoagulante.

### 3.2. Tipo de estudo e métodos moleculares utilizados para *Anaplasma marginale*

A maioria dos estudos encontrados teve como objetivo realizar a caracterização genética de *A. marginale* (n = 8), em diferentes contextos, como estudos epidemiológicos, longitudinais

e de investigação de surtos (Tabela 1). Seis artigos trouxeram informações sobre a epidemiologia de *A. marginale* (prevalência), seguidos de quatro estudos longitudinais, onde três envolveram investigação de transmissão transplacentária. Foram relatadas duas investigações de surtos, uma utilizando multiplex PCR e três estudos com o objetivo de avaliar a relação entre a infestação de carrapatos e a ocorrência de agentes da TPB. Apenas um artigo descreveu a avaliação da eficácia do tratamento contra *A. marginale* por PCR.

Tabela 1. Tipo de estudos realizados no Brasil para investigar a ocorrência de *Anaplasma marginale* em bovinos utilizando métodos moleculares

Tipo de estudo	Método molecular	Ref.
Epidemiologia (prevalência)	multiplex PCR	25
	PCR	26; 27
	nPCR	28*; 29
	snPCR	30
Caracterização genética	nPCR	31
Caracterização genética (epidemiologia)	qPCR	32; 33
Caracterização genética (longitudinal)	qPCR	34; 35
	Real time PCR	36
Caracterização genética (surto)	snPCR	37
	qPCR	37 <sup>1</sup> ; 38
Longitudinal (transmissão transplacentária)	PCR	39
	snPCR	14; 40
Estudo longitudinal	PCR	41
Investigação de surtos	multiplex PCR	42
	PCR	43
Relação entre carrapatos e TPB	PCR	44; 45
	qPCR	45; 46
Avaliação da eficácia do tratamento	PCR	47

\*A nPCR foi usada apenas para amostras negativas na primeira reação de PCR

<sup>1</sup>Os autores mencionaram que a qPCR foi realizada para amplificar o fragmento *msp1 $\alpha$* , mas referenciaram outro estudo <sup>(49)</sup> que utilizou primers para amplificar o gene *msp1 $\beta$*

Independente da técnica, o gene *msp5* foi alvo na maioria dos estudos que utilizaram a PCR convencional (n = 9), seguido pelo *msp1 $\alpha$* , *msp4* e *msp1 $\beta$* , respectivamente. Já para técnicas quantitativas, o gene alvo foi o *msp1*, com apenas três estudos usando *msp1 $\alpha$*  e cinco usando *msp1 $\beta$* . A construção da curva de calibração para quantificação das cópias de DNA foi realizada utilizando técnicas com plasmídeo ou fragmentos sintéticos de DNA (gBlocks™). Os resultados obtidos relataram quantificação absoluta de até  $4,36 \times 10^{12}$  cópias de DNA/ $\mu$ L (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação absoluta de cópias de DNA para genes de *Anaplasma marginale*, segundo metodologia de estudos realizados no Brasil

Quantificação absoluta (nº de cópias de DNA/ $\mu$ L)	Construção da curva padrão	Ref.
$3,28 \times 10^5$ (1ª coleta)	Plasmídeo	38
$3,23 \times 10^3$ (2ª coleta)		
$2,35 \times 10^5$ (3ª coleta)		
$1,5 \times 10^5$ (4ª coleta)		
$2,51 \times 10^3$ (1ª fase)	gBlocks™	46
$2,57 \times 10^3$ (2ª fase)		
$2,82 \times 10^3$ (3ª fase)		
$1,2 \times 10^3$ (4ª fase)		
$7,77 \times 10^2 - 1,97 \times 10^7$ (Lins, SP, Brasil)	N.D.	37
$1,27 \times 10^1 - 1,49 \times 10^4$ (Mambai, GO, Brasil)		
$2,87 \times 10^3$ (raça Brangus – 300 d idade)	gBlocks™	45
$5,45 \times 10^2$ (raça Nelore – 300 d idade)		
$9,72 \times 10^7$ (bezerros)	Plasmídeo	32
$3,19 \times 10^6$ (vacas)	Plasmídeo	33
$1,3 \times 10^6$ (bezerros)		
$3,9 \times 10^4$ (vacas)	Plasmídeo	34
$1,04 \times 10^1$ (1 d idade)		
$4,36 \times 10^{12}$ (90 d idade)		
$7,91 \times 10^4$ (180 d idade)		
$1,54 \times 10^5$ (270 d idade)		
$5,23 \times 10^5$ (360 d idade)		
$1,21 \times 10^1$ (1 d idade)		
$3,06 \times 10^6$ (90 d idade)	Plasmídeo	35
$2,15 \times 10^4$ (180 d idade)		
$2,24 \times 10^3$ (270 d idade)		
$3,37 \times 10^3$ (360 d idade)		

N.D.: informação não disponível

### 3.3. Tipo de estudo e métodos moleculares utilizados para *Babesia bigemina*

Os estudos sobre a prevalência de *B. bigemina* e sua correlação com a infestação por carrapatos corresponderam à maioria dos artigos publicados, sendo cinco estudos em cada categoria (Tabela 3). A caracterização genética não foi o objetivo principal de nenhum dos estudos e dois utilizaram genes-alvo de *B. bigemina* para comparar diferentes métodos moleculares. Este agente infeccioso também foi incluído em investigação epidemiológica e de surtos usando PCR multiplex.

Tabela 3. Tipo de estudos realizados no Brasil para investigar a ocorrência de *Babesia bigemina* em bovinos utilizando métodos moleculares

Tipo de estudo	Método molecular	Ref.
Influência da raça (TPB)	nPCR*	49
Epidemiologia (prevalência)	multiplex PCR	25
	nPCR*	28; 30
	PCR	29; 50
Longitudinal (transmissão transplacentária)	snPCR	40
Estudo longitudinal	PCR	41; 51; 52
Comparação de métodos	HRM**	53
	nPCR	54
	qPCR	53; 54
Investigação de surtos	multiplex PCR	42
Relação entre carrapatos e TPB	PCR	44
	nPCR*	55
	qPCR	46; 56; 57

\* A nPCR foi usada apenas para amostras negativas na primeira reação de PCR

\*\* técnica semiquantitativa – HRM: “High-resolution melting”

Além dos estudos de comparação de métodos, a qPCR foi realizada em três artigos buscando a relação do número de *R. microplus*, em diferentes estágios de vida, com cópias de DNA de *B. bigemina*. Para esta espécie, a proteína hipotética parcial de mRNA e o RNA ribossômico 18S (*18SrRNA*) foram os genes-alvo da maioria dos trabalhos com PCR convencional ( $n = 6$  e  $n = 5$ , respectivamente), assim como para qPCR citocromo B mitocondrial (*mt-cyb*) foi o principal gene investigado. Plasmídeos, gBlocks™ e cultura de hemácias inoculadas experimentalmente foram utilizados para construir curvas padrão para *B. bigemina* e o número de cópias de DNA/ $\mu\text{L}$  variou de  $6,6 \times 10^{-1}$  a  $4,4 \times 10^3$  (Tabela 4).

Tabela 4. Quantificação absoluta de cópias de DNA para genes de *Babesia bigemina*, segundo metodologia de estudos realizados no Brasil

Quantificação absoluta (nº de cópias de DNA/ $\mu\text{L}$ )	Construção da curva padrão	Ref.
$6,6 \times 10^{-1}$	Plasmídeo	56
$3,24 \times 10^2$ (1ª fase)	gBlocks™	46
$8,32 \times 10^1$ (2ª fase)		
$1,2 \times 10^2$ (3ª fase)	N.D.	57
$1,7 \times 10^1$ (4ª fase)		
$7,08 \times 10^1$	Cultura de hemácias positivas	54
$2,5 \times 10^1 - 2,5 \times 10^2$ *		
$4,4 \times 10^3$		

N.D.: informação não disponível

\* não. de parasitas/ $\mu\text{L}$

### 3.4. Tipo de estudo e métodos moleculares utilizados para *Babesia* spp. e *Babesia bovis*

Primers não específicos para as espécies de *Babesia*, visando o gene *18SrRNA*, foram utilizados para estudo de caracterização genética das linhagens presentes em bezerros da raça Holandês e para investigação de surto em bovinos Nelore no estado do Acre (Tabela 5). Ao

todo, 21 artigos se utilizaram de técnicas moleculares para detectar *B. bovis*, sendo: sete levantamentos epidemiológicos; quatro comparando a relação entre contagem de carrapatos, ou carga parasitária de carrapatos, e TPB; três com comparação de métodos; dois sobre diversidade genética e estudo longitudinal; um sobre transmissão transplacentária; e uma investigação de surto da doença.

Tabela 5. Tipo de estudos realizados no Brasil para investigar a ocorrência de *Babesia* spp. e *Babesia bovis* em bovinos utilizando métodos moleculares

<b>Tipo de estudo</b>	<b>Método molecular</b>	<b>Ref.</b>
Epidemiologia (prevalência)	multiplex PCR	25
	PCR	29; 50
	nPCR*	28; 30; 58
	qPCR	59
Caracterização genética	nPCR	31 <sup>1</sup>
Diversidade genética	nPCR	60; 61
Longitudinal (transmissão transplacentária)	snPCR	40
Estudo longitudinal	PCR	41; 52
Comparação de métodos	HRM**	53
	PCR	62
	nPCR	54
	qPCR	53; 54; 62
Investigação de surtos	multiplex PCR	42
	PCR	43 <sup>1</sup>
Relação entre carrapatos e TPB	PCR	44
	nPCR*	55
	qPCR	56; 57

\*A nPCR foi usada apenas para amostras negativas na primeira reação de PCR

\*\*Técnica semiquantitativa – HRM: “High-resolution melting”

<sup>1</sup>Primers usados para *Babesia* spp.

Para *B. bovis*, *rap1a* foi o gene escolhido para oito estudos, *18SrRNA* para quatro, *sbp2* e *sbp1* para dois e um estudos, respectivamente, e *mt-cyB* também para somente um dos experimentos que utilizaram PCR convencional. Este último, foi o gene mais investigado nas técnicas de qPCR, enquanto *18SrRNA* e *msa2c* foram usados somente em um trabalho cada. Em relação à quantificação absoluta, o número de parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue em bovinos no estado do Mato Grosso do Sul variou entre  $2,5 \times 10^2 - 2,5 \times 10^3$ . Já considerando os demais estudos, o número de cópias de DNA variou de 3,09 a  $5,62 \times 10^5/\mu\text{L}$  (Tabela 6).

Tabela 6. Quantificação absoluta de cópias de DNA para genes de *Babesia* spp. e *Babesia bovis*, segundo metodologia de estudos realizados no Brasil

Quantificação absoluta (n° de cópias de DNA/ $\mu$ L)	Construção da curva padrão	Ref.
$5,62 \times 10^5$ (Angus)	Plasmídeo	59
$1,95 \times 10^4$ (Angus x Nelore)		
$1,2 \times 10^4$ (Nelore)		
3,09	Plasmídeo	56
$3,31 \times 10^2$ (1ª fase)	gBlocks™	46
$8,91 \times 10^1$ (2ª fase)		
$3,63 \times 10^1$ (3ª fase)		
$1,91 \times 10^1$ (4ª fase)		
38,02	N.D.	57
$*2,5 \times 10^2 - 2,5 \times 10^3$	Cultura de hemácias positivas	54
$2.2 \times 10^2$	gBlocks™	53

N.D.: informação não disponível

\*n° de parasitas/ $\mu$ L

### 3.5. Ocorrência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *B. bovis* no Brasil

Um total de 45 rebanhos em 14 estados brasileiros foram avaliados em busca de animais infectados por *A. marginale*. Em 19 rebanhos, a menor categoria de tamanho amostral (10 a 50 animais) foi utilizada. A coleta de 51 a 100 amostras de bovinos foram coletadas em 13 rebanhos, e em 12 rebanhos mais de 100 animais foram incluídos nas avaliações: 5 rebanhos, de 101 a 200 animais; e em 8 rebanhos, de 201 a 400 animais (Figura 2). Com base em dados compilados desses rebanhos, a ocorrência molecular de *A. marginale* em cada estado foi: 68,68% no Acre; 46,97% na Bahia; 38% em Goiás; 95,78% no Maranhão; 57,74% em Minas Gerais; 68,47% no Mato Grosso do Sul; 60,98% na Paraíba; 76,24% no Piauí; 75% no Paraná; 80,59% no Rio de Janeiro; 98,78% em Rondônia; 35% no Rio Grande do Sul; 55,35% em Santa Catarina; e 97,90% em São Paulo.

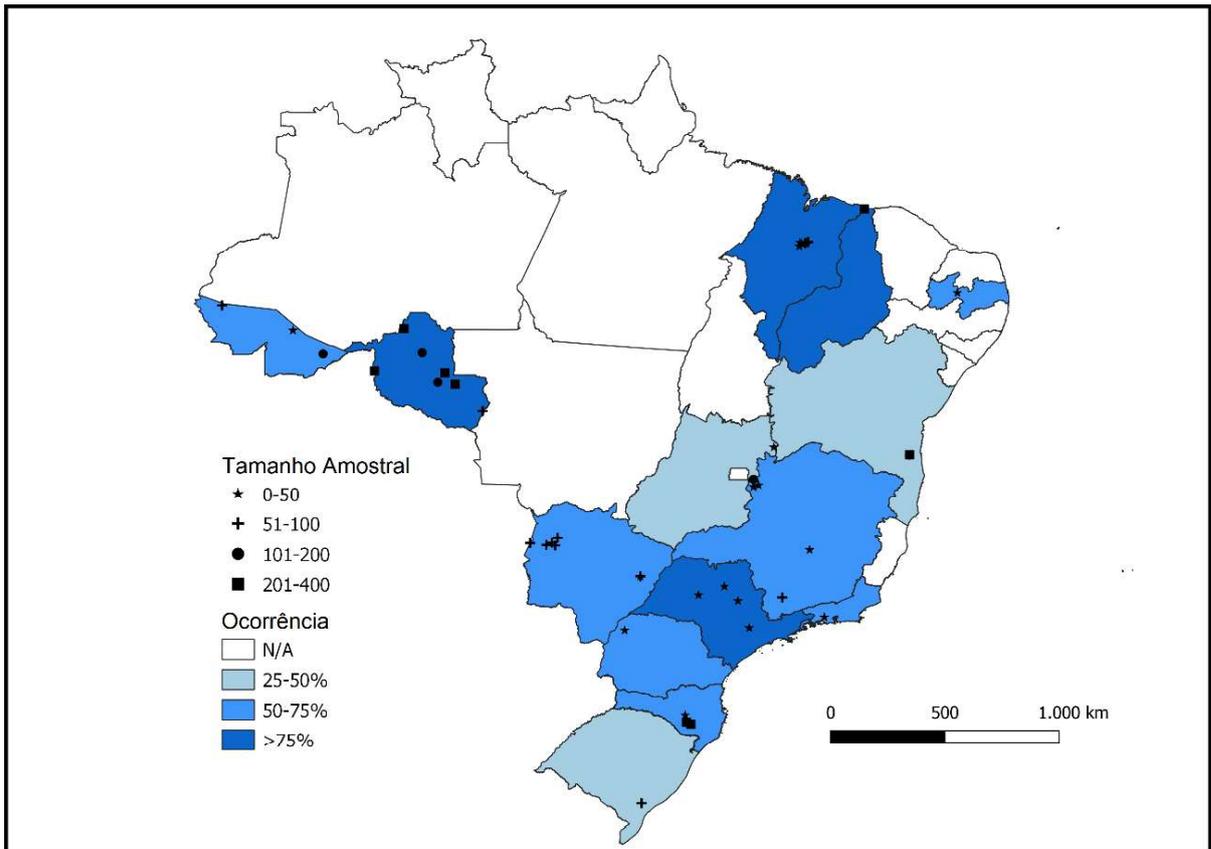


Figura 2. Ocorrência (%) de animais infectados com *Anaplasma marginale* em rebanhos bovinos no Brasil, de acordo com estudos que utilizaram métodos moleculares para diagnóstico. O mapa foi criado utilizando o software QGIS <sup>(24)</sup>.

*Babesia bigemina* foi investigada em 22 rebanhos em nove estados, onde 10 a 50 animais foram amostrados em 10 rebanhos, 51 a 100 em cinco, 101 a 200 em três e 201 a 400 animais em quatro rebanhos (Figura 3). A ocorrência molecular desse agente foi: 26,57% na Bahia; 66,67% em Goiás; 8,19% no Maranhão; 19,05% em Minas Gerais; 74,46% em Mato Grosso do Sul; 17,07% na Paraíba; 50,66% no Piauí; 39,98% em Santa Catarina; e 86,25% em São Paulo.

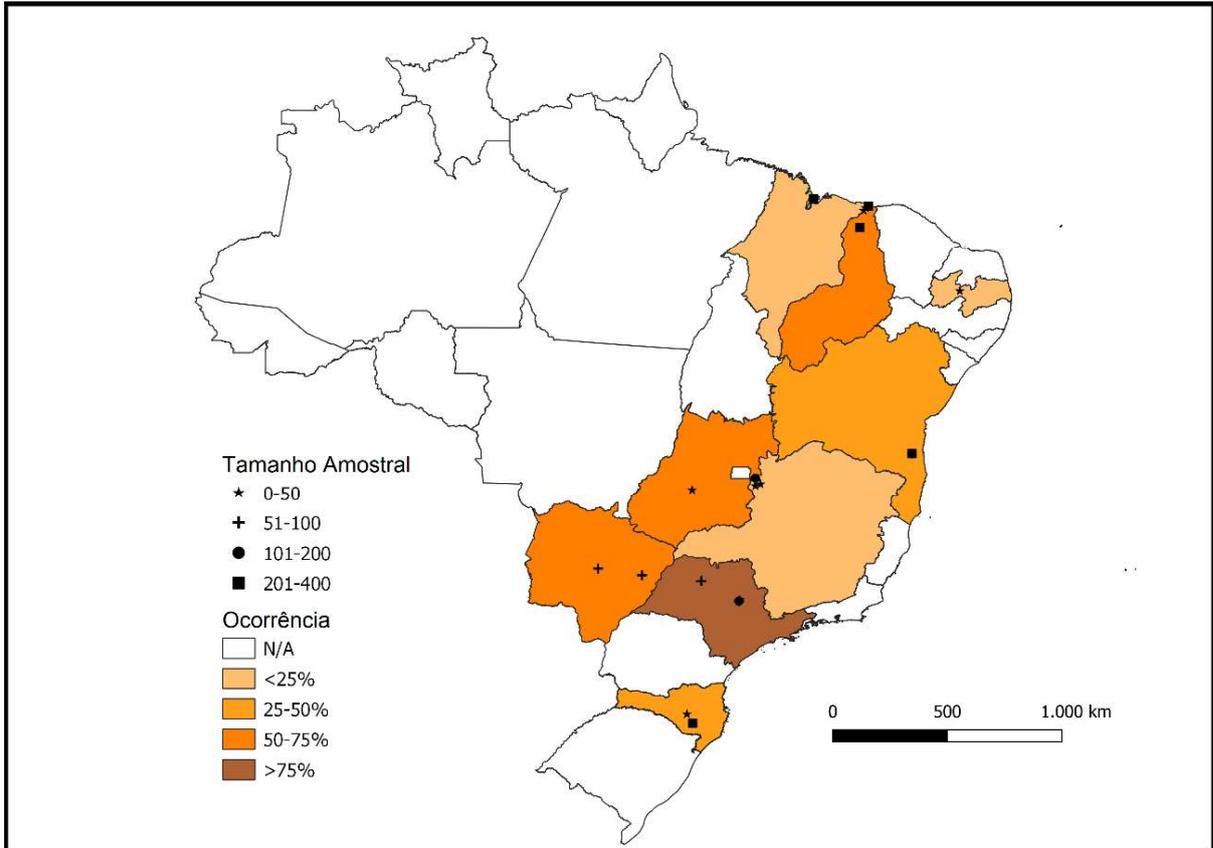


Figura 3. Ocorrência (%) de animais infectados com *Babesia bigemina* em rebanhos bovinos no Brasil, de acordo com estudos que utilizaram métodos moleculares para diagnóstico. O mapa foi criado utilizando o software QGIS <sup>(24)</sup>.

Nos dois rebanhos onde foram utilizados primers para *Babesia* spp., menos de 50 bovinos foram amostrados nos estados de Minas Gerais e Acre. Já para detecção de *B. bovis*, amostras em 16 rebanhos foram coletadas de 10 a 50 animais, em oito rebanhos de 51 a 100, em três rebanhos de 101 a 200 e em dois de 201 a 400 animais. A ocorrência molecular de *Babesia* spp. e *B. bovis* foi: 87,47% no Acre; 24,17% na Bahia; 32,38% no Maranhão; 19,64% em Minas Gerais; 9,28% no Mato Grosso do Sul; 7,32% na Paraíba; 37,72% no Piauí; 95,47% em Rondônia; 10% no Rio Grande do Sul; 23,99% em Santa Catarina; e 91,13% em São Paulo.

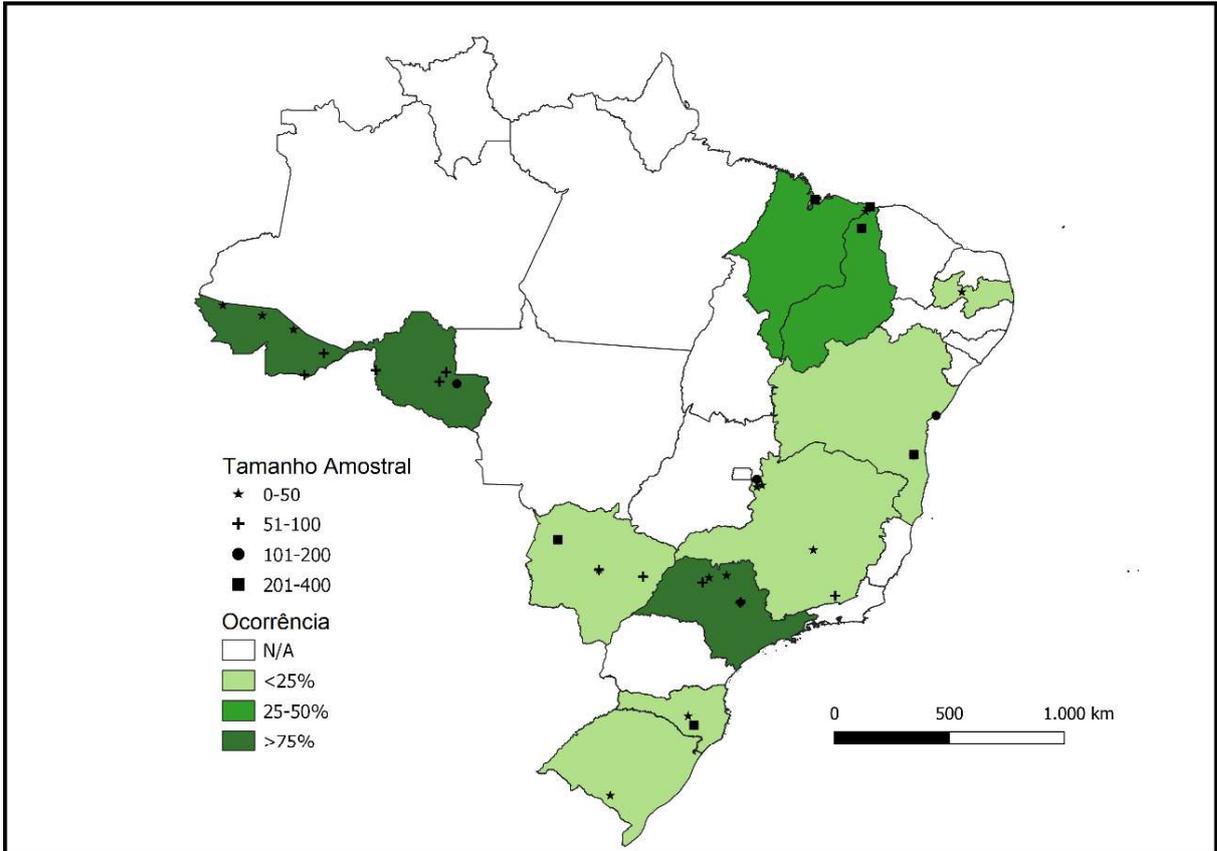


Figura 4. Ocorrência (%) de animais infectados com *Babesia* spp. e *Babesia bovis* em rebanhos bovinos no Brasil, de acordo com estudos que utilizaram métodos moleculares para diagnóstico. O mapa foi criado utilizando o software QGIS <sup>(24)</sup>.

Compilando dados de doze artigos, que relataram bovinos infectados com mais de um agente da TPB <sup>(25, 29, 40, 43 – 44, 50, 52, 53, 55 – 57)</sup>, observou-se que 31,9% dos animais apresentaram coinfeção (342/1.071). As coinfeções foram: 53,5% (n = 183) com *B. bovis* + *B. bigemina*; 30,7% (n = 105) com *Babesia* spp. + *A. marginale*; 6,4% (n = 22) com *A. marginale* + *B. bigemina*; 5,6% (n = 19) com *A. marginale* + *B. bovis*; e 3,8% (n = 13) com *A. marginale* + *B. bigemina* + *B. bovis*.

Animais com sintomas clínicos foram descritos em 17 rebanhos devido a *A. marginale* (n = 218 animais), em dois rebanhos devido a *B. bovis* e *B. bigemina* (n = 5 animais) e 15 animais que apresentaram sintomas em um rebanho foram infectados com *Babesia* spp. O tratamento sintomático foi relatado em cinco artigos <sup>(30, 35, 38, 43, 47)</sup> e a quimioprofilaxia para TPB era realizada em fazendas investigadas em um estudo <sup>(52)</sup>. O controle de carrapatos foi relatado em três estudos <sup>(27, 29, 44)</sup>. Apenas em três fazendas, foi mencionada a morte de animais, e devido à infecção por *A. marginale* <sup>(35, 37, 40)</sup>. Em um dos estudos, foi mencionado que os animais do rebanho morreram durante um surto, mas não foi especificado se as amostras

analisadas pertenciam a algum dos animais mortos <sup>(37)</sup>. Nenhum dos estudos apresentou dados referentes à avaliação *post mortem*.

Mapas estaduais individuais sobre cidades/regiões específicas onde ocorreu amostragem para todos os agentes infecciosos da TPB estão disponíveis no Arquivo Suplementar 2.

#### **4. Discussão**

Este é o primeiro estudo com dados de ocorrência obtidos apenas por meio de diagnóstico molecular. Pela visualização dos mapas de ocorrência aqui apresentados, foi possível observar lacunas e oportunidades para as pesquisas sobre TPB realizadas no Brasil. Os três estados brasileiros que detêm os maiores rebanhos são Mato Grosso (MT), Goiás (GO) e Pará (PA), representando 36% da quantidade total de bovinos <sup>(1)</sup>. Dos estudos apresentados nesta revisão, apenas de um rebanho em GO foram coletadas amostras para investigar a ocorrência de *A. marginale* e um para *B. bigemina*, enquanto não houve estudos que utilizaram amostras originárias de MT ou PA. Isso sugere que, apesar de ser uma valiosa ferramenta diagnóstica, esses métodos ainda são utilizados exclusivamente para fins de pesquisa e não para a prática de rotina em sistemas de produção. Certamente, dentre os fatores impeditivos para frequente utilização de técnicas moleculares estão o alto custo de execução, visto que a maioria dos equipamentos e material de consumo são importados e a necessidade de equipamentos e pessoal especializados.

Outra lacuna significativa observada após a análise dos estudos aqui apresentados é a questão da quantificação de perdas produtivas devido à infecção por agentes *A. marginale* e *Babesia* spp. Comumente, autores mencionam perdas significativas para os produtores por causa da doença, da necessidade de tratamento, do aborto e da morte animal <sup>(63)</sup>. No entanto, nenhum dos trabalhos encontrados teve por objetivo quantificar o prejuízo pela presença ou intensidade da infecção nos rebanhos avaliados. Quanto a essa temática, um estudo conduzido no estado de MG avaliou temperatura retal e esfregaço sanguíneo de 395 bezerras da raça Holandês para detecção de *A. marginale* e *Babesia* spp. Os pesquisadores propuseram uso racional de antibióticos e antiparasitários nesses animais e concluíram que essa estratégia pode economizar em torno de 77,99% dos gastos com medicamentos para controle da TPB <sup>(7)</sup>. Isso demonstra que, para a rotina das propriedades, é valioso se utilizar medidas para diagnóstico e detecção destes parasitas para melhor determinação de estratégias de controle e redução de custos.

O esfregaço sanguíneo é uma técnica de realização simples e auxilia no diagnóstico de animais com babesiose e anaplasmoses agudas, porém para identificação de animais com infecções crônicas (persistentemente infectados) é necessário que se utilize técnicas moleculares<sup>(14)</sup>. Não foram encontrados estudos que possam determinar como esses baixos níveis de infecção afetam ou põem em risco os bovinos em diferentes fases da vida e de diferentes aptidões (desmame, período de transição de vacas leiteiras etc). Também, outras situações importantes para a aplicação de técnicas moleculares, principalmente as quantitativas, são: eficácia de manejo quimioprofilático e avaliação de eficácia de vacinação<sup>(62)</sup>; variação do nível de infecção antes e depois do transporte; e durante o manejo reprodutivo (IATF). Um único trabalho incluído nesta revisão utilizou PCR convencional para determinar a eficácia de diferentes tratamentos instituídos para *A. marginale*. Neste estudo foi observado que ao longo do período de avaliação, o número de animais positivos dentro de cada grupo foi diminuindo, embora nenhum dos protocolos tenha sido eficaz para eliminar o agente de todos os animais<sup>(47)</sup>.

As técnicas de biologia molecular têm maior sensibilidade e especificidade e são úteis para resolver limitações encontradas com outras ferramentas de diagnóstico, como resultados falso-positivos devido a artefatos de coloração em esfregaços de sangue<sup>(64)</sup>. Ainda, usando a PCR quantitativa e semiquantitativa é possível determinar não somente o parasita envolvido, mas a intensidade da infecção<sup>(14)</sup>. No entanto, devido a procedimentos mais complexos e maiores custos para realização de técnicas moleculares, vários estudos realizados no Brasil investigaram a infecção por *Babesia* spp. e *A. marginale* utilizando esfregaços de sangue (diagnóstico direto) e/ou hematócrito, sendo esta última uma forma complementar para verificar indiretamente o comprometimento da saúde animal<sup>(7, 65 – 68)</sup>.

Estratégias utilizadas em alguns dos estudos possivelmente foram capazes de reduzir o tempo e os custos, principalmente quando se envolve o processamento de muitas amostras. A multiplex PCR foi utilizada somente em dois estudos<sup>(25, 42)</sup>, sendo que nenhum relatou o uso da abordagem multiplex em técnicas quantitativas de PCR. Esta pode ser uma ferramenta valiosa em levantamentos epidemiológicos, principalmente como há probabilidade de um animal apresentar coinfeção<sup>(18)</sup>. Outra opção para reduzir os custos é o estabelecimento de projetos de cooperação entre os centros de pesquisa e os serviços veterinários públicos oficiais, podendo atingir um maior número de fazendas sem custos extras. Tal estratégia foi utilizada em dois trabalhos, no Acre e em Rondônia, citados nessa revisão<sup>(26, 58)</sup>.

## 5. Conclusão

Considerando os 38 artigos incluídos nessa revisão, a menor ocorrência molecular de *A. marginale* foi de 35% no estado do RS e a maior (98,78%) em RO. Para *B. bigemina* a menor e maior ocorrência foram no estado do MA (8,19%) e em SP (86,25%), respectivamente. Já para *B. bovis*, o estado de RO também obteve maior ocorrência, sendo 95,47% dos animais avaliados positivos para este parasita e a menor no estado da PB (7,32%).

Apesar da quantidade de dados encontrada, ainda são evidentes diversas lacunas no que diz respeito à ausência de dados referente a estados com grandes rebanhos bovinos (MT e PA). Também, há oportunidades de direcionamento para futuras pesquisas no que diz respeito ao uso de técnicas moleculares, avaliação da eficácia de tratamentos e/ou protocolos preventivos e quantificação das perdas nos rebanhos de maior ocorrência de casos clínicos da TPB.

### **Declaração de conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflitos de interesses.

### **Referências**

1. IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal 2021 [Internet]. [citado 16 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>
2. Barros GSC, Castro NR, Machado GC, Almeida FMS, Almeida AN. Boletim Mercado de Trabalho do Agronegócio Brasileiro. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA). 2022. [Internet]. [citado 16 de janeiro de 2023]. Disponível em: [https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Cepea\\_Mercado%20de%20Trabalho\\_2T2022.pdf](https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/kceditor/files/Cepea_Mercado%20de%20Trabalho_2T2022.pdf)
3. Grisi L, Leite RC, Martins JR de S, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* junho de 2014; 23:150–6. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>
4. Oliveira PA de, Ruas JL, Riet-Correa F, Coelho ACB, Santos BL, Marcolongo-Pereira C, et al. Doenças parasitárias em bovinos e ovinos no sul do Brasil: frequência e estimativa de perdas econômicas. *Pesq Vet Bras.* agosto de 2017;37(8):797–801. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017000800003>
5. Almazan C, Tipacamu GA, Rodriguez S, Mosqueda J, Leon AP de. Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in Bioscience-Landmark.* 1º de março de 2018;23(8):1535–51. Disponível em: <https://doi.org/10.2741/4659>
6. Narladkar BW. Projected economic losses due to vector and vector-borne parasitic diseases in livestock of India and its significance in implementing the concept of integrated practices for vector management. *Vet World.* fevereiro de 2018;11(2):151–60. Disponível em: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.151-160>
7. Souza RS, Resende MFS, Ferreira LCA, Ferraz RS, Araújo MVV, Bastos CV, et al. Monitoring bovine tick fever on a dairy farm: An economic proposal for rational use of

- medications. *Journal of Dairy Science*. 1º de maio de 2021;104(5):5643–51. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19504>
8. Henker LC, Lorenzett MP, Fagundes-Moreira R, Dalto AGC, Sonne L, Driemeier D, et al. Bovine abortion, stillbirth and neonatal death associated with *Babesia bovis* and *Anaplasma* sp. infections in southern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 1º de julho de 2020;11(4):101443. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101443>
  9. Hornok S, Földvári G, Elek V, Naranjo V, Farkas R, de la Fuente J. Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol*. 4 de julho de 2008;154(3–4):354–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.019>
  10. Santos LR, Gaspar EB, Benavides MV, Trentin G. Tristeza Parasitária Bovina - Medidas de controle atuais. - Portal Embrapa 2019 [Internet]. [citado 16 de janeiro de 2023]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1107099/tristeza-parasitaria-bovina---medidas-de-controle-atuais>
  11. Ferreira GCM, Canozzi MEA, Peripolli V, Moura G de P, Sánchez J, Martins CEN. Prevalence of bovine *Babesia* spp., *Anaplasma marginale*, and their co-infections in Latin America: Systematic review-meta-analysis. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 1º de julho de 2022;13(4):101967. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101967>
  12. Kieser ST, Eriks IS, Palmer GH. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect Immun*. abril de 1990;58(4):1117–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.58.4.1117-1119.1990>
  13. Yokoyama N, Okamura M, Igarashi I. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. *Veterinary Parasitology*. 31 de maio de 2006;138(1):22–32. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.037>
  14. Silva JB da, Castro GN de S, Fonseca AH. Longitudinal study of risk factors for anaplasmosis and transplacental transmission in herd cattle. *Sem Ci Agr*. 4 de setembro de 2014;35(4Supl):2491. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n4Suplp2491>
  15. Alvarez JA, Rojas C, Figueroa JV. Diagnostic Tools for the Identification of *Babesia* sp. in Persistently Infected Cattle. *Pathogens*. 9 de setembro de 2019;8(3):143. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens8030143>
  16. Aubry P, Geale DW. A Review of Bovine Anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2011;58(1):1–30. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>
  17. Echaide ST, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, McElwain TF. Detection of Cattle Naturally Infected with *Anaplasma marginale* in a Region of Endemicity by Nested PCR and a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5. *J Clin Microbiol*. março de 1998;36(3):777–82. Disponível em: [10.1128/JCM.36.3.777-782.1998](https://doi.org/10.1128/JCM.36.3.777-782.1998)
  18. AL-Hosary AAT. Comparison between conventional and molecular methods for diagnosis of bovine babesiosis (*Babesia bovis* infection) in tick infested cattle in upper Egypt. *J Parasit Dis*. março de 2017;41(1):243–6. Disponível em: [10.1007/s12639-016-0785-2](https://doi.org/10.1007/s12639-016-0785-2)
  19. Parodi P, Corbellini LG, Leotti VB, Rivero R, Miraballes C, Riet-Correa F, et al. Validation of a multiplex PCR assay to detect *Babesia* spp. and *Anaplasma marginale* in cattle in Uruguay in the absence of a gold standard test. *J Vet Diagn Invest*. janeiro de 2021;33(1):73–9. Disponível em: [10.1177/1040638720975742](https://doi.org/10.1177/1040638720975742)

20. Kovalchuk SN, Babii AV, Arkhipova AL. Real-time PCR assay with an endogenous internal amplification control for detection and quantification of *Anaplasma marginale* in bovine blood. *Ticks Tick Borne Dis.* março de 2020;11(2):101334. Disponível em: [10.1016/j.ttbdis.2019.101334](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101334)
21. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ.* 29 de março de 2021;372: n71. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01626-4>
22. Zotero. Corporation for Digital Scholarship, EUA. Versão 6.0.10, 2022. (<https://www.zotero.org/>)
23. Excel. Microsoft Office and Student, 2019. (<https://www.microsoft.com/pt-br/>)
24. QGIS Geographic Information System, QGIS Association. Versão 3.28 Firenze, 2022. (<http://www.qgis.org>)
25. Vieira LL, Canever MF, Cardozo LL, Cardoso CP, Herkenhoff ME, Neto AT, et al. Prevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and *Babesia bigemina* in cattle in the Campos de Lages region, Santa Catarina state, Brazil, estimated by multiplex-PCR. *Parasite Epidemiology and Control.* 1º de agosto de 2019;6:e00114. Disponível em: [10.1016/j.parepi.2019.e00114](https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00114)
26. Brito LG, Oliveira MC de S, Rocha RB, Silva Netto FG da, Marim AD, Souza GCR de, et al. *Anaplasma marginale* infection in cattle from south-western Amazonia. *Pesq Vet Bras.* março de 2010; 30:249–54. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/zybDtwJbbsJFN5rsfKMw8v/?format=pdf&lang=en>
27. Casa M da S, Vettori J de M, Souza KM de, Miletti LC, Vogel CIG, Lima ALF, et al. High prevalence of *Anaplasma marginale* in the Crioula Lageana cattle. *The Journal of Infection in Developing Countries.* 30 de junho de 2020;14(06):623–30. Disponível em: [10.3855/jidc.11691](https://doi.org/10.3855/jidc.11691)
28. Amorim LS, Wenceslau AA, Carvalho FS, Carneiro PLS, Albuquerque GR. Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* setembro de 2014;23:328–36. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014064>
29. Souza F de AL, Braga JFV, Pires LV, Carvalho CJS de, Costa ÉA, Ribeiro MFB, et al. Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in Northeastern Brazil. *Pesq Vet Bras.* setembro de 2013;33(9):1057–61. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000900002>
30. Bahia M, Silva J de S, Gontijo IS, Cordeiro MD, Santos PN dos, Silva CB da, et al. Characterization of cattle tick fever in calves from the northwestern region of Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet [Internet].* 9 de abril de 2020 [citado 8 de junho de 2022];29. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rbpv/a/MHyYWLHzDHhJHRGxJLy5wyK/?lang=en>
31. Silvestre BT, Silveira JAG, Meneses RM, Facury-Filho EJ, Carvalho AU, Ribeiro MFB. Identification of a vertically transmitted strain from *Anaplasma marginale* (UFMG3): Molecular and phylogenetic characterization, and evaluation of virulence. *Ticks and Tick-borne Diseases.* 1º de fevereiro de 2016;7(1):80–4. Disponível em: [10.1016/j.ttbdis.2015.09.001](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.09.001)
32. Pereira JG, Garcia AB, Gonçalves LR, Ramos IA de S, Braga M do SCO, Santos LS dos, et al. High genetic diversity of *Anaplasma marginale* infecting dairy cattle in northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet [Internet].* 10 de dezembro de 2021 [citado 8 de junho de 2022];22. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-2961202100002>

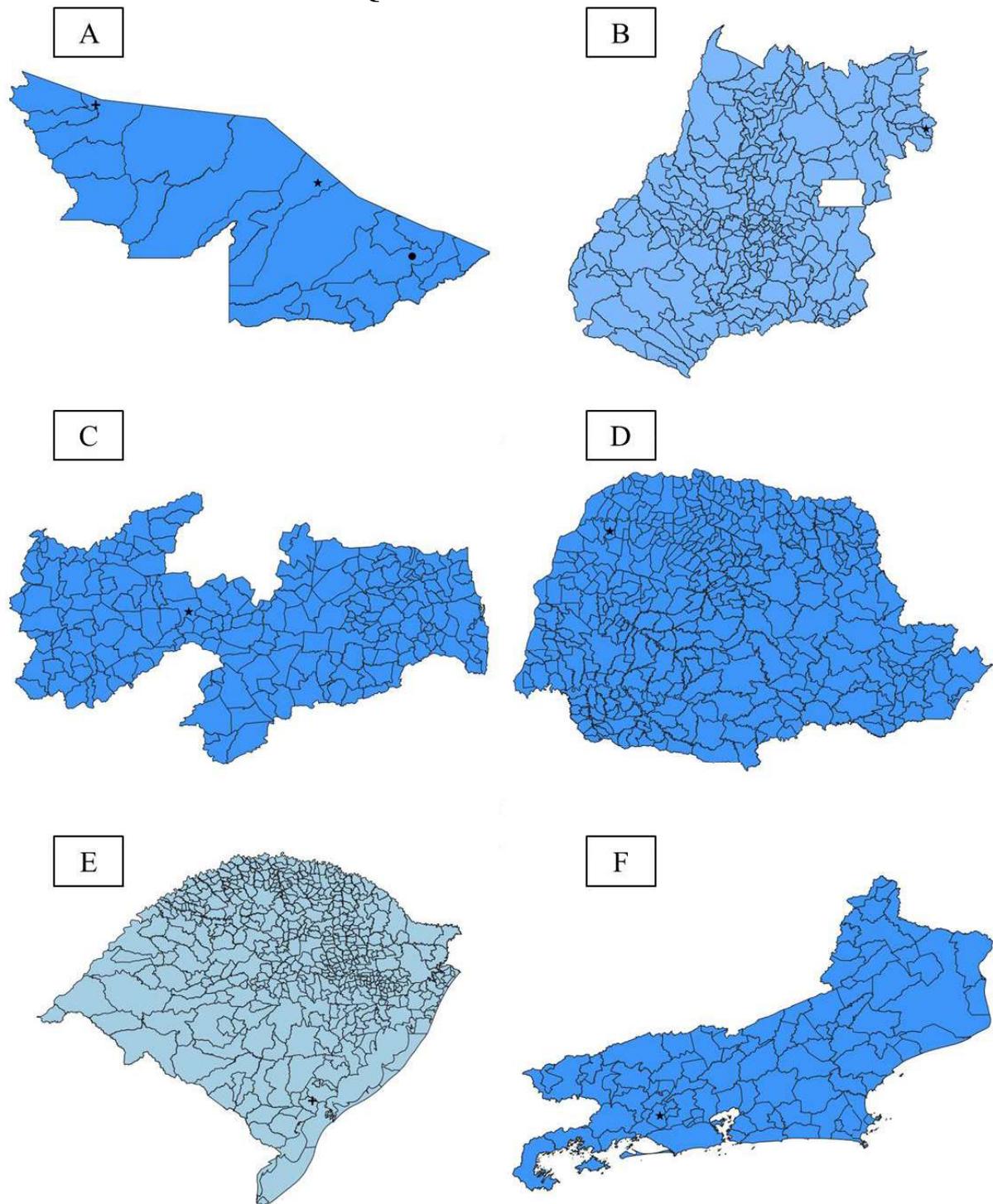
- 2022];30. Disponível em:  
<http://www.scielo.br/j/rbpv/a/s44hHdSqdKbHPBzd7gzgqy/?lang=en>
33. Ramos IAS, Herrera HM, Fernandes SJ, Amaral RB, Zanatto DCS, Silva, TMV, et al. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in beef cattle in the Brazilian Pantanal. Ticks and Tick-borne Diseases. [Internet]. Junho de 2019 [citado 8 de junho de 2022]. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1877959X18304114?token=C3785683E97C2CBC1FC17AF7E562763FF6D6CD144CFEDB489D8324B169C9B7B4504A0967040DB17B1649BC0489D088F0&originRegion=us-east-1&originCreation=20220608182516>
  34. Silva JB, Gonçalves LR, Varani A de M, André MR, Machado RZ. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* studied longitudinally under natural transmission conditions in Rio de Janeiro, Brazil. Ticks and Tick-borne Diseases. 1º de junho de 2015;6(4):499–507. Disponível em: 10.1016/j.ttbdis.2015.04.002
  35. Silva JB, André MR, Machado RZ. Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. Ticks and Tick-borne Diseases. 1º de fevereiro de 2016;7(1):20–5. Disponível em: 10.1016/j.ttbdis.2015.07.018
  36. Pohl AE, Cabezas-Cruz A, Ribeiro MFB, Silveira JAG da, Silaghi C, Pfister K, et al. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. março de 2013;22(1):129–35. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000100024>
  37. Machado RZ, Silva JB da, André MR, Gonçalves LR, Matos CA, Obregón D. Outbreak of anaplasmosis associated with the presence of different *Anaplasma marginale* strains in dairy cattle in the states of São Paulo and Goiás, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 4 de dezembro de 2015;24(4):438–46. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015078>
  38. Garcia K, Weakley M, Do T, Mir S. Current and Future Molecular Diagnostics of Tick-Borne Diseases in Cattle. Veterinary Sciences. maio de 2022;9(5):241. Disponível em: 10.3390/vetsci9050241
  39. Grau HEG, Cunha Filho NA da, Pappen FG, Farias NA da R. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. junho de 2013;22:189–93. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000200038>
  40. Costa SCL, de Magalhães VCS, de Oliveira UV, Carvalho FS, de Almeida CP, Machado RZ, et al. Transplacental transmission of bovine tick-borne pathogens: Frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic stability in the northeast of Brazil. Ticks and Tick-borne Diseases. 1º de março de 2016;7(2):270–5. Disponível em: 10.1016/j.ttbdis.2015.11.001
  41. Costa VMM, Ribeiro MFB, Duarte GAFP, Soares JF, Azevedo SS, Barros ATM, et al. Incidência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros no semiárido paraibano. Pesq Vet Bras. abril de 2018;38:605–12. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4786>
  42. Canever MF, Vieira LL, Reck C, Richter L, Miletti LC. First Evaluation of an Outbreak of Bovine Babesiosis and Anaplasmosis in Southern Brazil Using Multiplex PCR. Korean J Parasitol. 22 de outubro de 2014;52(5):507–11. Disponível em: 10.3347/kjp.2014.52.5.507
  43. Reckziegel GH, Bayma DB, Silva TIB da, Fernandes RB, Kassab S, Souza MD, et al. Outbreak of bovine tick-borne disease on a riverside property in the Western Amazonia: Case report. Revista Brasileira de Ciência Veterinária [Internet]. 26 de julho de 2022 [citado

- 28 de setembro de 2022];29(1). Disponível em: <https://periodicos.uff.br/rbcv/article/view/43127>
44. Andreotti R, Barros JC, Garcia MV, Rodrigues V da S, Higa L de OS, Duarte PO, et al. Cattle tick infestation in Brangus cattle raised with Nellore in central Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*. 4 de maio de 2018;39(3):1099–114. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1101878/cattle-tick-infestation-in-brangus-cattle-raised-with-nellore-in-central-brazil>
  45. Martins KR, Garcia MV, Bonatte-Junior P, Duarte PO, de Higa LOS, Csordas BG, et al. Correlation between *Rhipicephalus microplus* ticks and *Anaplasma marginale* infection in various cattle breeds in Brazil. *Exp Appl Acarol*. 1º de agosto de 2020;81(4):585–98. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00514-1>
  46. Giglioti R, de Oliveira HN, Bilhassi TB, Portilho AI, Okino CH, Marcondes CR, et al. Estimates of repeatability and correlations of hemoparasites infection levels for cattle reared in endemic areas for *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 30 de janeiro de 2018;250:78–84. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.12.010>
  47. Alberton LR, Orlandini CF, Zampieri TM, Nakamura AY, Gonçalves DD, Piau Júnior R, et al. Eficácia do dipropionato de imidocarb, da enrofloxacina e do cloridrato de oxitetraciclina no tratamento de bovinos naturalmente infectados por *Anaplasma marginale*. *Arq Bras Med Vet Zootec*. agosto de 2015;67(4):1056–62. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-7999>
  48. Carelli G, Decaro N, Lorusso A, Elia G, Lorusso E, Mari V, et al. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Veterinary Microbiology*. 20 de setembro de 2007;124(1):107–14. Disponível em: [ff10.1016/j.vetmic.2007.03.022](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.022)
  49. Oliveira MCS, Oliveira-Sequeira TCG, Regitano LCA, Alencar MM, Néo TA, Silva AM, et al. Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. *Veterinary Parasitology*. 17 de agosto de 2008;155(3):281–6. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.022>
  50. Costa FB, Melo SA, Araújo FR, Alberto C, Ramos DN, Carvalho-Neta AV, et al. SEROLOGICAL, PARASITOLOGICAL AND MOLECULAR ASSESSMENT OF *Babesia bovis* AND *Babesia bigemina* IN CATTLE FROM STATE OF MARANHÃO. *Revista Caatinga*. 2015;28(2):8. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1087978/1/26SEROLOGICALPARASITOLOGICALANDMOLECULARASSESSMENTOFBabesiabovisANDBabesiabigeminainCATTLEFROMSTATEOFMARANHAO2015.pdf>
  51. Santana ÂP, Linhares GFC, Murata LS, Bernal FE, Torres FA. DINÂMICA DA INFECÇÃO NATURAL POR *Babesia bigemina* EM BEZERROS A PARTIR DO NASCIMENTO DETECTADO PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE. *Ciência Animal Brasileira*. 2008;9(3):10. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/1486>. Acesso em: 17 jan. 2023.
  52. Souza F de AL, Liarte A de SC, Castro KN de C, Beserra EEA, Bernardi JCM, Sousa GV de, et al. Dynamics of natural infection by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in dairy cattle from an enzootic instability area in Northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 1º de março de 2018;27:2–6. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612018008>
  53. Giglioti R, Okino CH, Azevedo BT, Wedy BCR, Gutmanis G, Veríssimo CJ, et al. Semi-quantitative evaluation of *Babesia bovis* and *B. bigemina* infection levels estimated by HRM

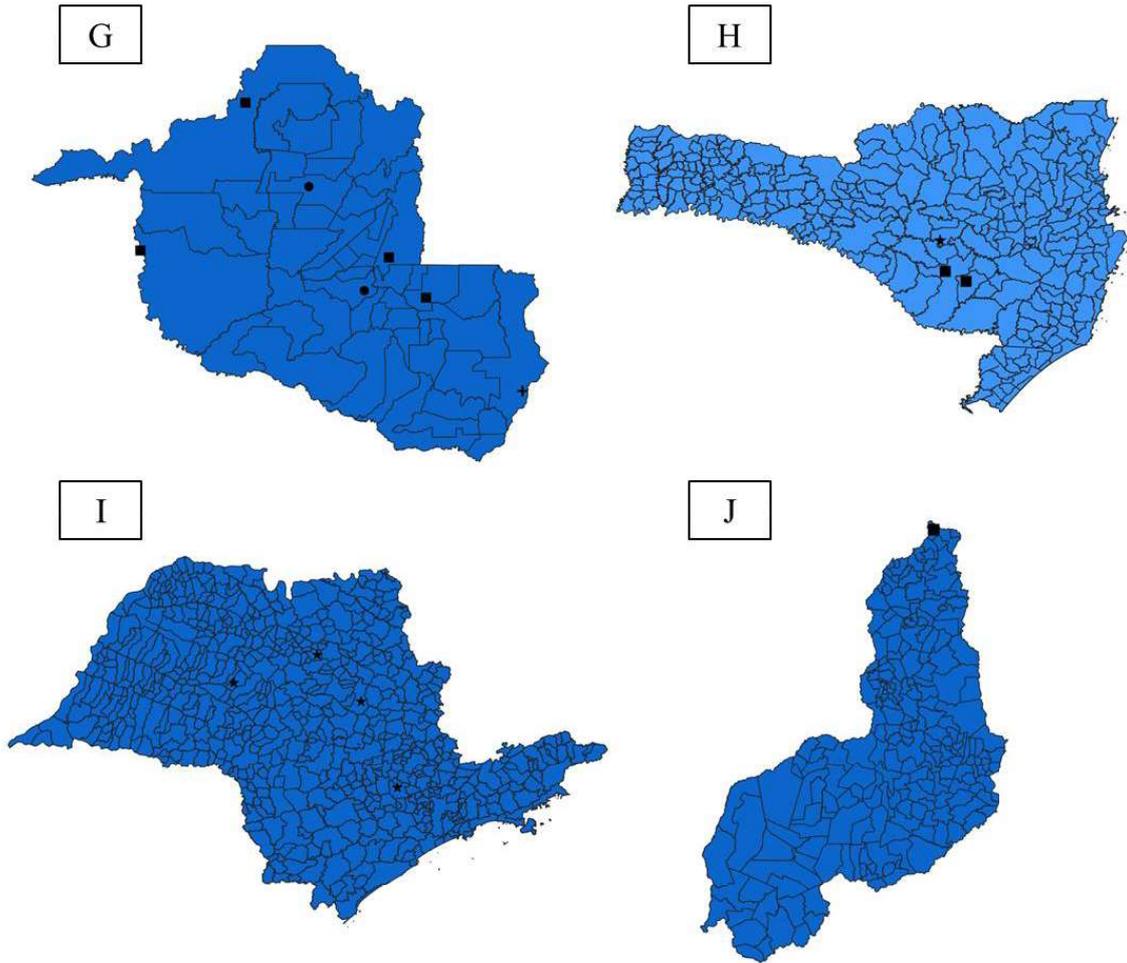
- analysis. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 1º de setembro de 2021;12(5):101753. Disponível em: [10.1016/j.ttbdis.2021.101753](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101753)
54. Kim C, Iseki H, Herbas MS, Yokoyama N, Suzuki H, Xuan X, et al. Development of Taqman-Based Real-Time PCR Assays for Diagnostic Detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1º de novembro de 2007;77(5):837–41. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17984338/>
  55. Oliveira MCS, Oliveira-Sequeira TCG, Araujo JP, Amarante AFT, Oliveira HN. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 10 de junho de 2005;130(1):61–7. Disponível em: [10.1016/j.vetpar.2005.03.007](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.007)
  56. Giglioti R, Oliveira HN, Santana CH, Ibelli AMG, Néo TA, Bilhassi TB, et al. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 1º de julho de 2016;7(5):657–62. Disponível em: [10.1016/j.ttbdis.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.011)
  57. Giglioti R, de Oliveira HN, Okino CH, de Sena Oliveira MC. qPCR estimates of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels in beef cattle and *Rhipicephalus microplus* larvae. *Exp Appl Acarol*. 1º de junho de 2018;75(2):235–40. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0260-0>
  58. Brito LG, Rocha RB, Barbieri F da S, Ribeiro ES, Vendrami FB, Souza GCR, et al. *Babesia bovis* infection in cattle in the southwestern Brazilian Amazon. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 1º de fevereiro de 2013;4(1):78–82. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.08.001>
  59. Bilhassi TB, Oliveira HN, Ibelli AMG, Giglioti R, Regitano LCA, Oliveira-Sequeira TCG, et al. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 1º de abril de 2014;5(3):234–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.002>
  60. Mendes NS, de Souza Ramos IA, Herrera HM, Campos JBV, de Almeida Alves JV, de Macedo GC, et al. Genetic diversity of *Babesia bovis* in beef cattle in a large wetland in Brazil. *Parasitol Res*. 1º de julho de 2019;118(7):2027–40. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06337-3>
  61. Nagano D, Sivakumar T, De De Macedo ACC, Inpankaew T, Alhassan A, Igarashi I, et al. The Genetic Diversity of Merozoite Surface Antigen 1 (MSA-1) among *Babesia bovis* Detected from Cattle Populations in Thailand, Brazil and Ghana. *J Vet Med Sci*. 2013;75(11):1463–70. Disponível em: [10.1292/jvms.13-0251](https://doi.org/10.1292/jvms.13-0251)
  62. Ramos CAN, Araújo FR, Souza IIF, Bacanelli G, Luiz HL, Russi LS, et al. Real-time polymerase chain reaction based on *msa2c* gene for detection of *Babesia bovis*. *Veterinary Parasitology*. 28 de fevereiro de 2011;176(1):79–83. Disponível em: [10.1016/j.vetpar.2010.10.035](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.035)
  63. Kocan KM, de la Fuente J, Step DL, Blouin EF, Coetzee JF, Simpson KM et al. Current challenges of the management and epidemiology of bovine anaplasmosis | *The Bovine Practitioner*. 2010; Disponível em: <https://bovine-ojs-tamu.tdl.org/bovine/index.php/bovine/article/view/2755>

64. Silaghi C, Santos AS, Gomes J, Christova I, Matei IA, Walder G, et al. Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma* spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. *Vector Borne Zoonotic Dis.* janeiro de 2017;17(1):12–22. Disponível em: 10.1089/vbz.2016.1960
65. Bastos TSA, Cruvinel LB, Ferreira LL, Nicaretta JE, Couto LFM, Zapa DMB, et al. Delayed reduction of *Anaplasma marginale* parasitemia and packed cell volume normalization despite prolonged enrofloxacin treatment of cattle co-infected with *Trypanosoma vivax*. *Parasitol Res.* agosto de 2021;120(8):2929–37. Disponível em: 10.1007/s00436-021-07226-4
66. Lopes TV, Souza JG da SG de, Almeida SB, Batista C de C, Rocha M de A, Schons S de V, et al. Ocorrência de *Babesia* spp. em amostras hematológicas em vacas Nelore e a importância de sua profilaxia na Cidade de Porto Velho – Rondônia. *Research, Society and Development.* 4 de agosto de 2021;10(10):e04101018085–e04101018085. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i10.18085>
67. Heller LM, Zapa DMB, Couto LFM, de Aquino Gontijo LM, Nicaretta JE, de Moraes IML, et al. Techniques for monitoring dairy calves against the tick fever agents: a comparative analysis. *Vet Res Commun.* setembro de 2022;46(3):879–902. Disponível em: 10.1007/s11259-022-09915-6
68. Teixeira VA, Lana AMQ, Bresolin T, Tomich TR, Souza GM, Furlong J, et al. Using rumination and activity data for early detection of anaplasmosis disease in dairy heifer calves. *Journal of Dairy Science.* maio de 2022;105(5):4421–33. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20952>

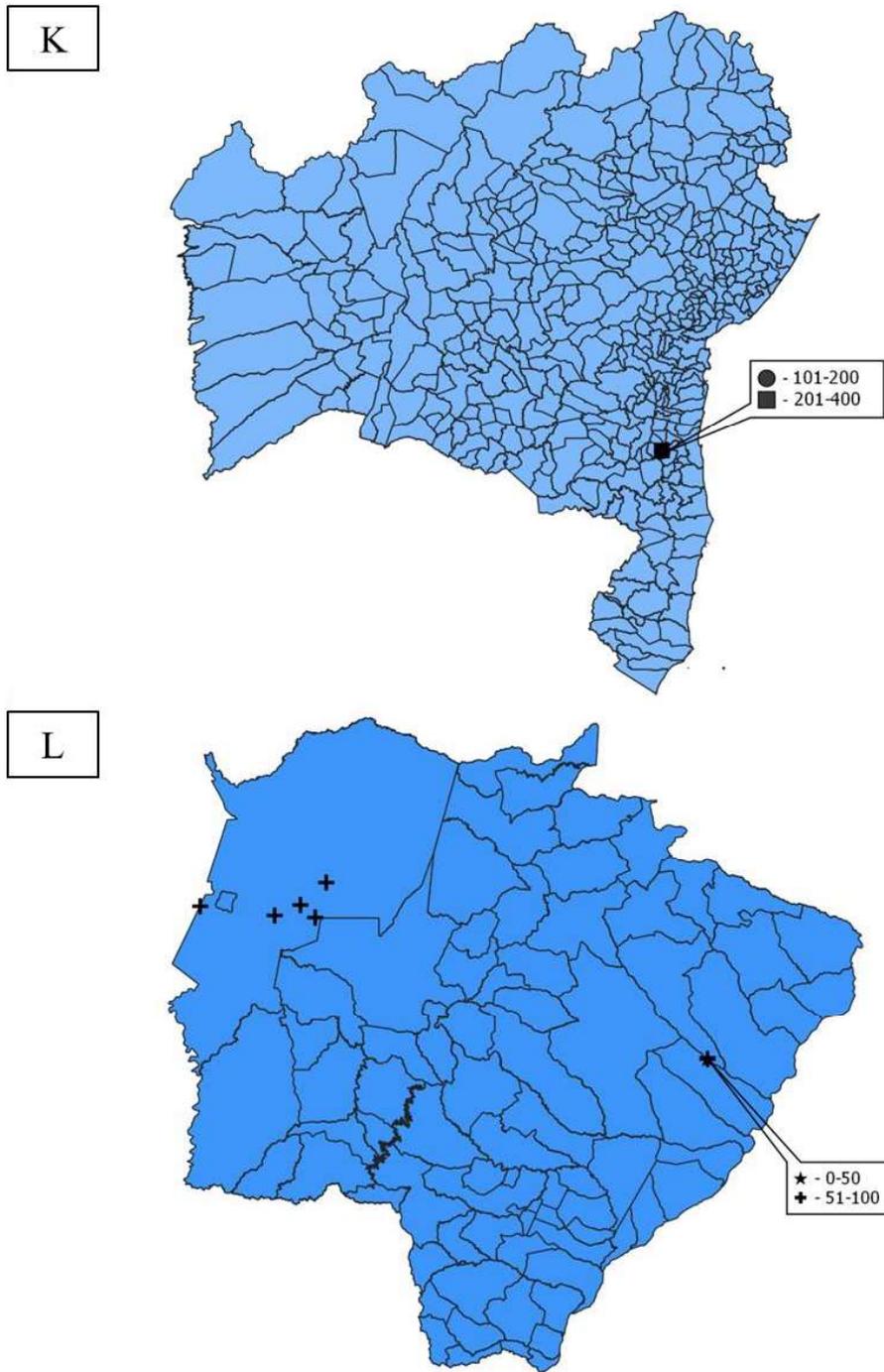
## ARQUIVO SUPLEMENTAR 2



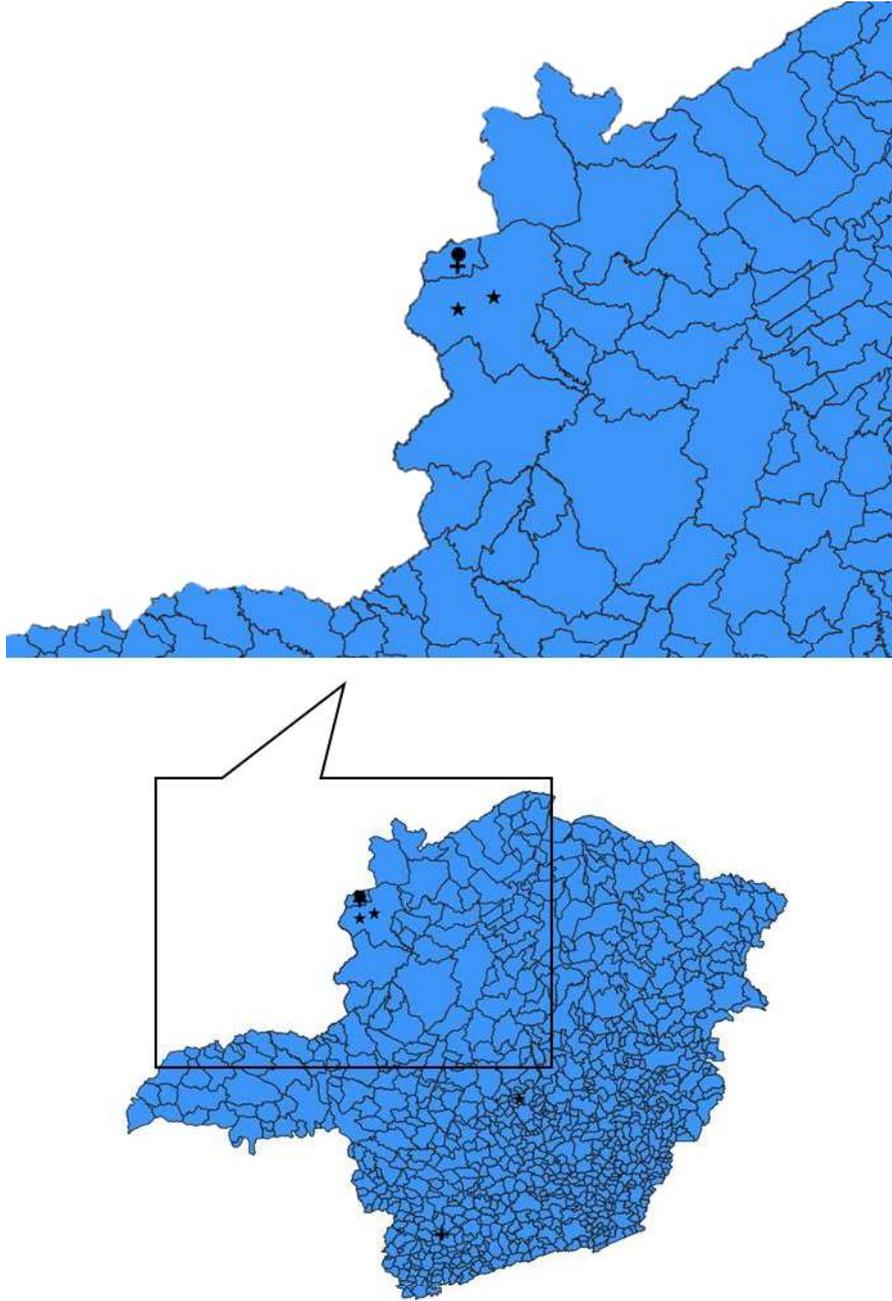
Localização dos estudos sobre *Anaplasma marginale* nos estados do Acre (A), Goiás (B), Paraíba (C), Paraná (D), Rio Grande do Sul (E) e Rio de Janeiro (F).



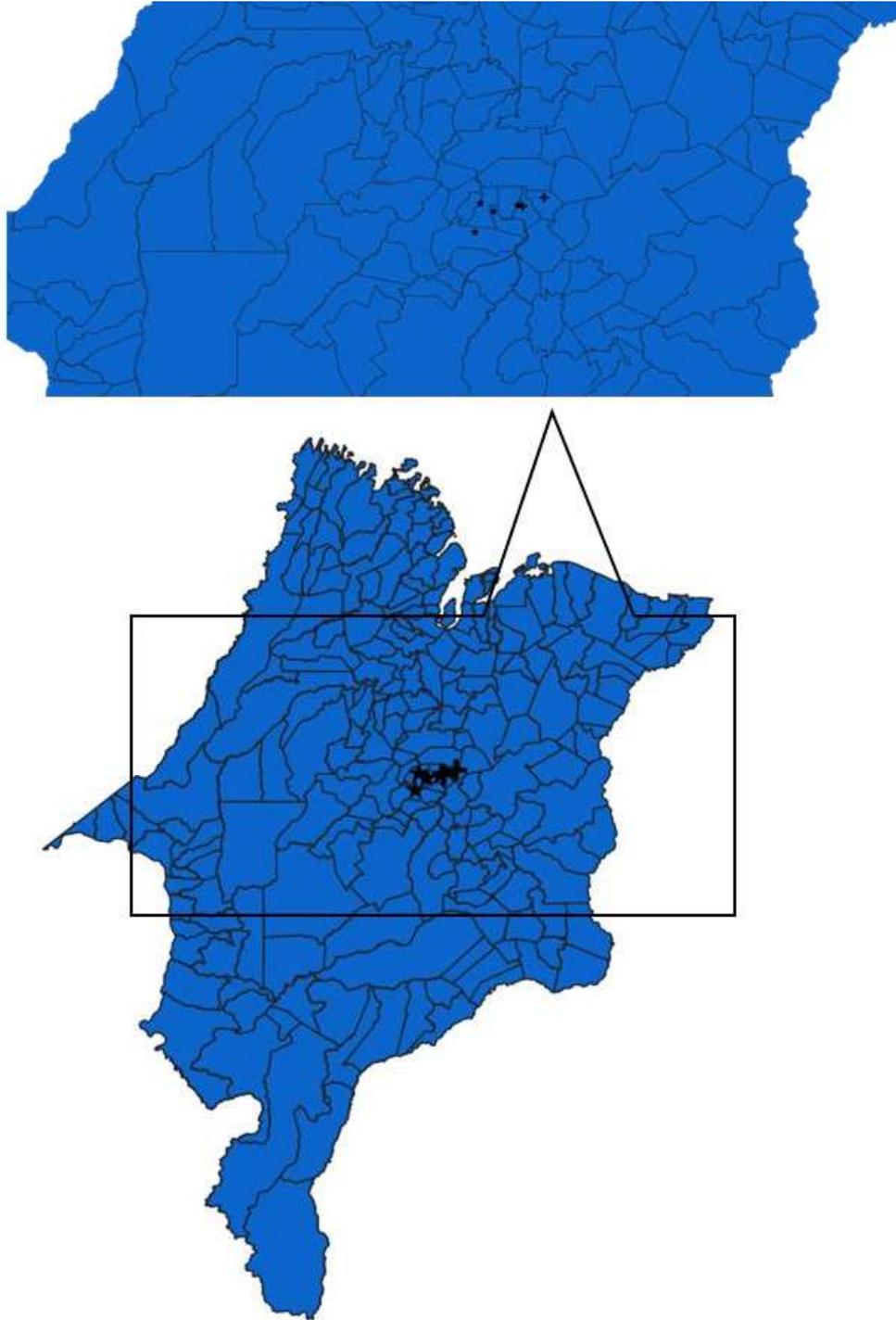
Localização dos estudos sobre *Anaplasma marginale* nos estados de Rondônia (G), Santa Catarina (H), São Paulo (I) e Piauí (J).



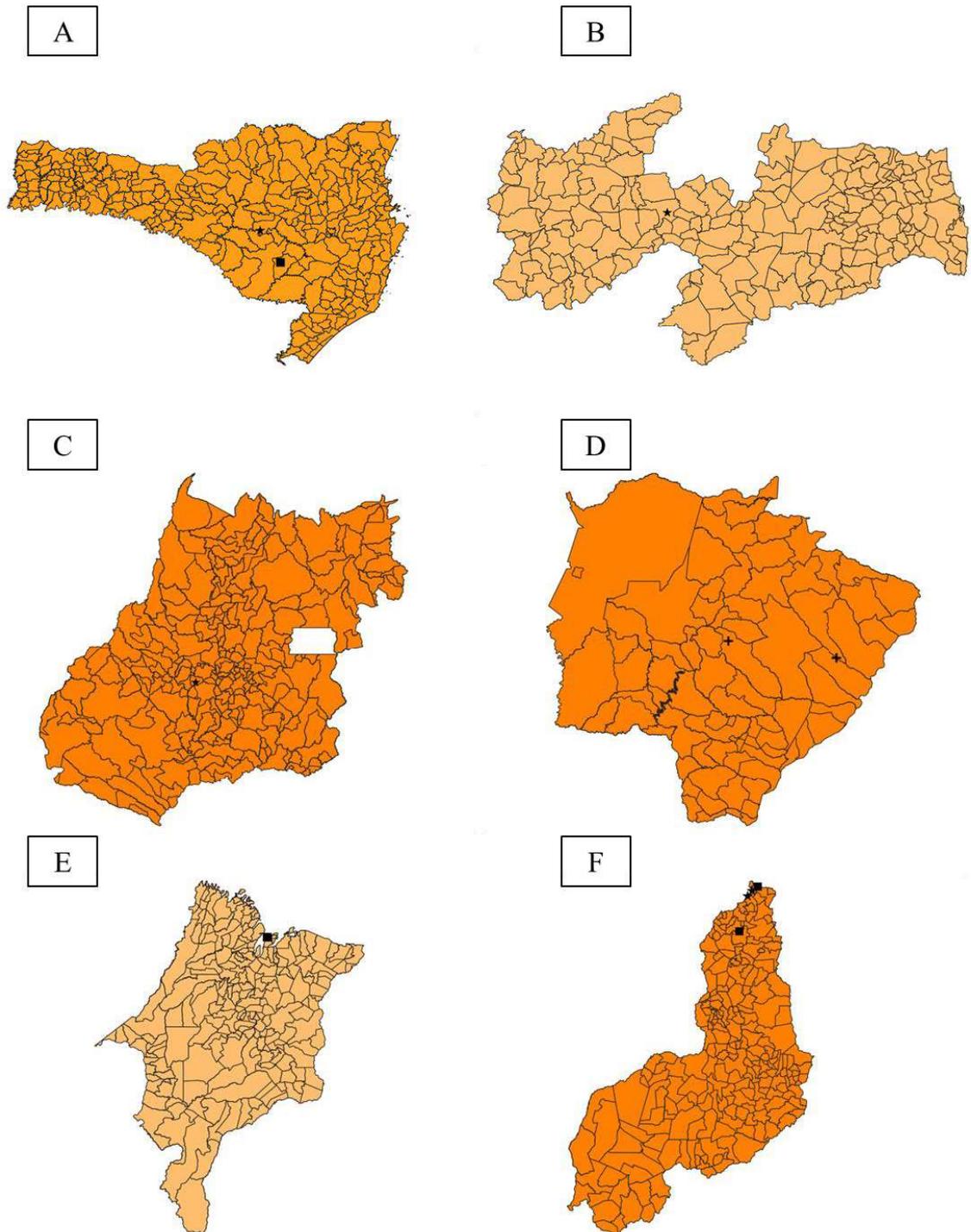
Localização dos estudos sobre *Anaplasma marginale* no estado da Bahia (K) e Mato Grosso do Sul (L).



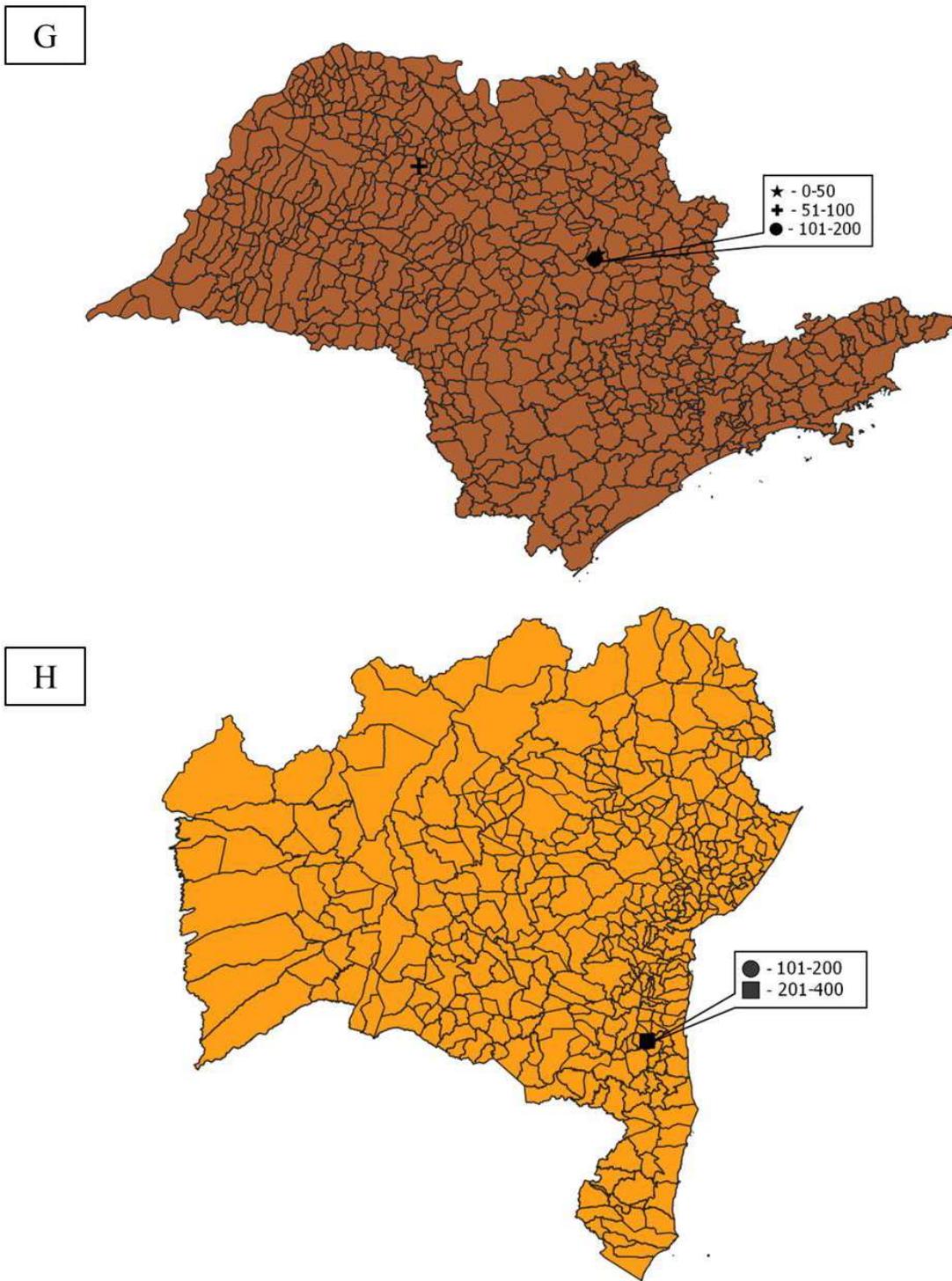
Localização dos estudos sobre *Anaplasma marginale* no estado de Minas Gerais.



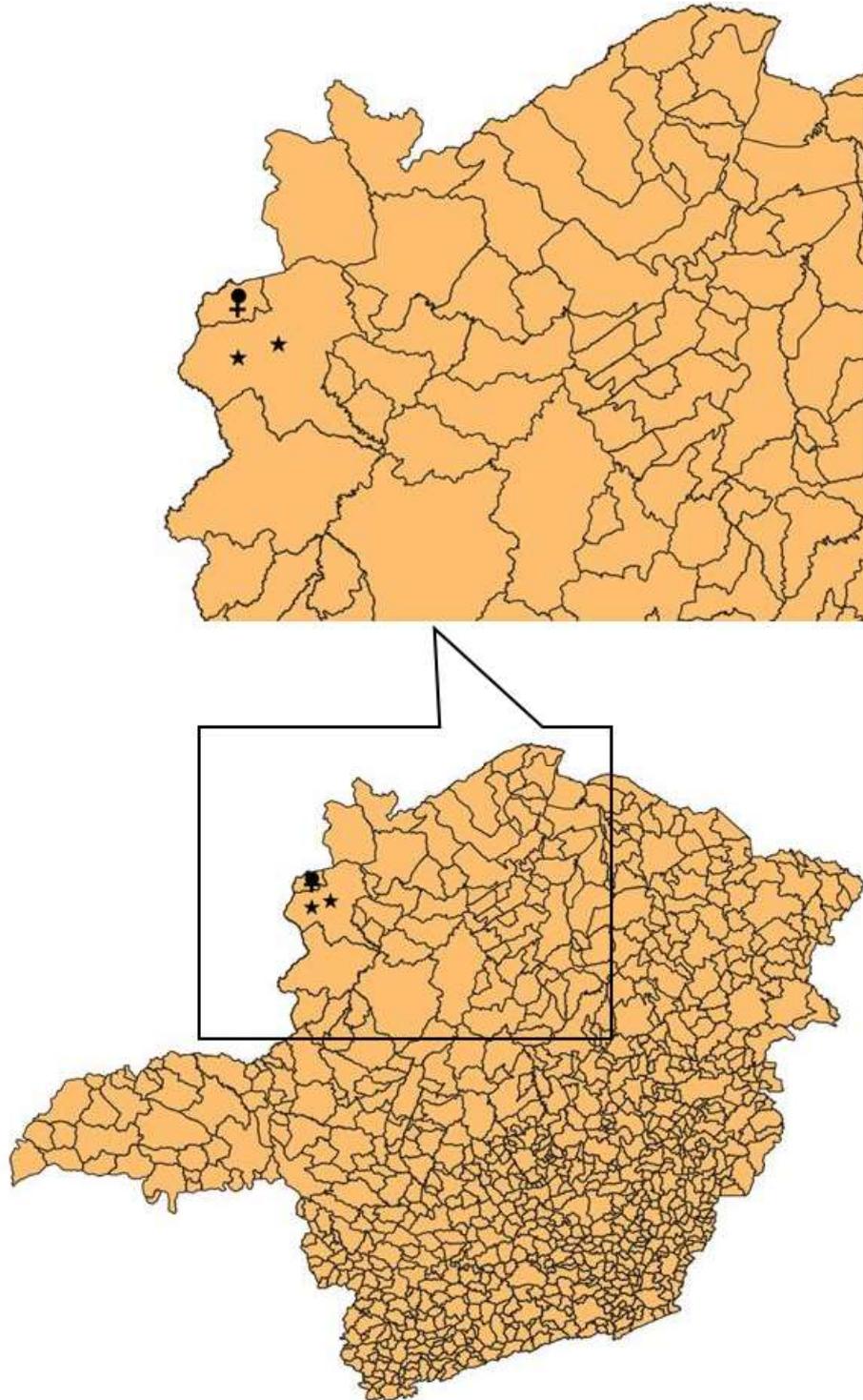
Localização dos estudos sobre *Anaplasma marginale* no estado do Maranhão.



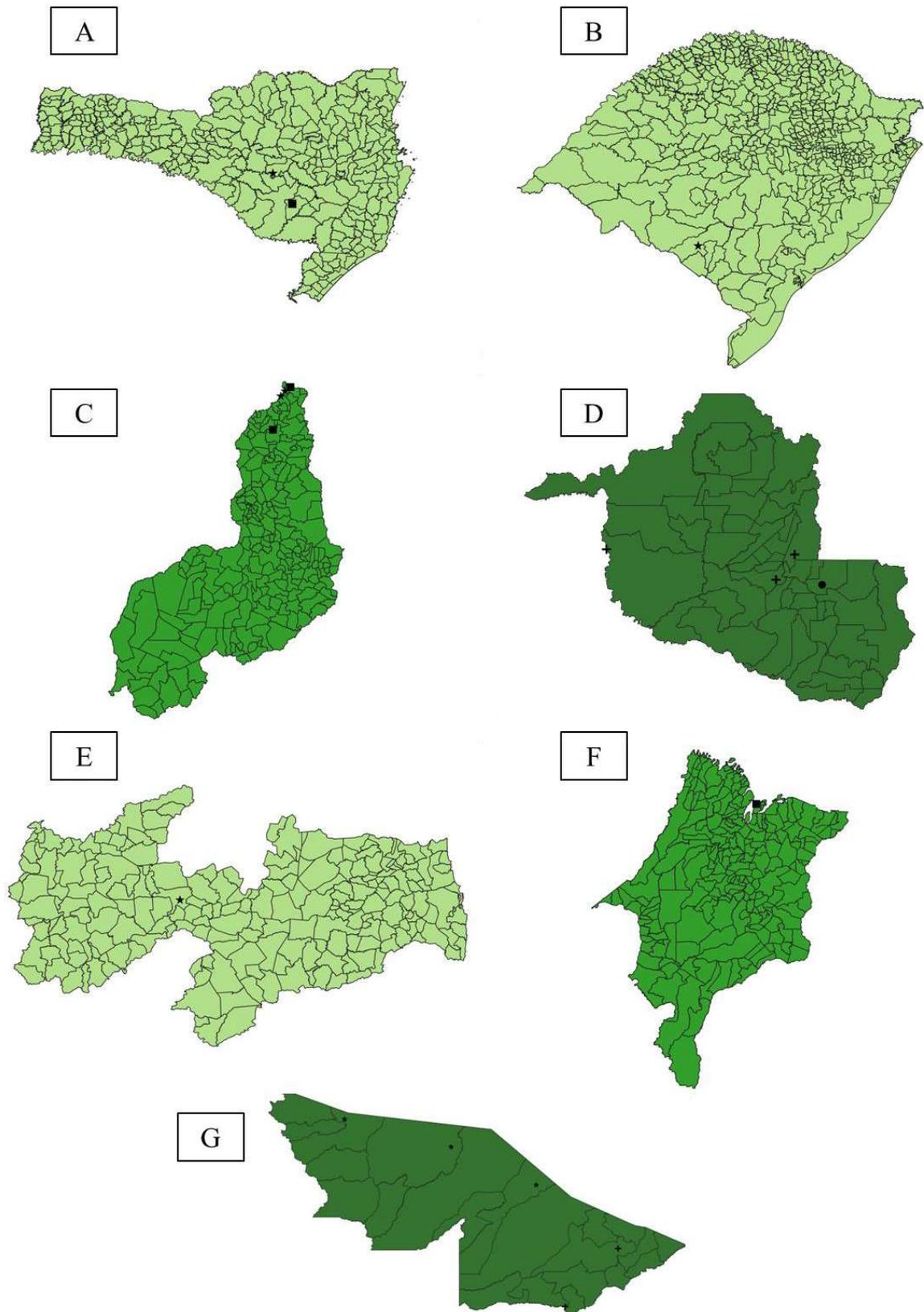
Localização dos estudos sobre *Babesia bigemina* nos estados de Santa Catarina (A), Paraíba (B), Goiás (C), Mato Grosso do Sul (D), Maranhão (E) e Piauí (F).



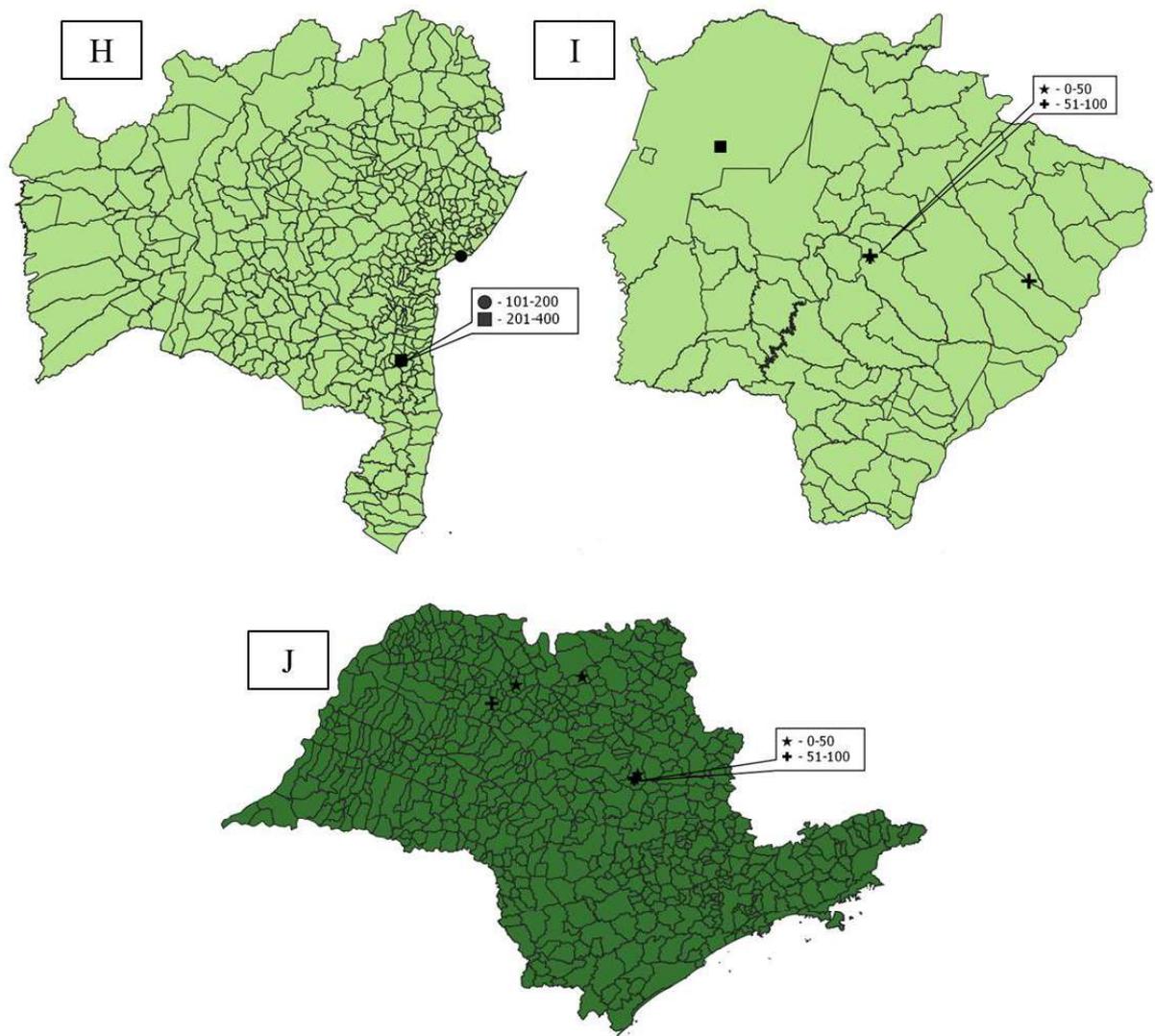
Localização dos estudos sobre *Babesia bigemina* nos estados de São Paulo (G) e Bahia (H).



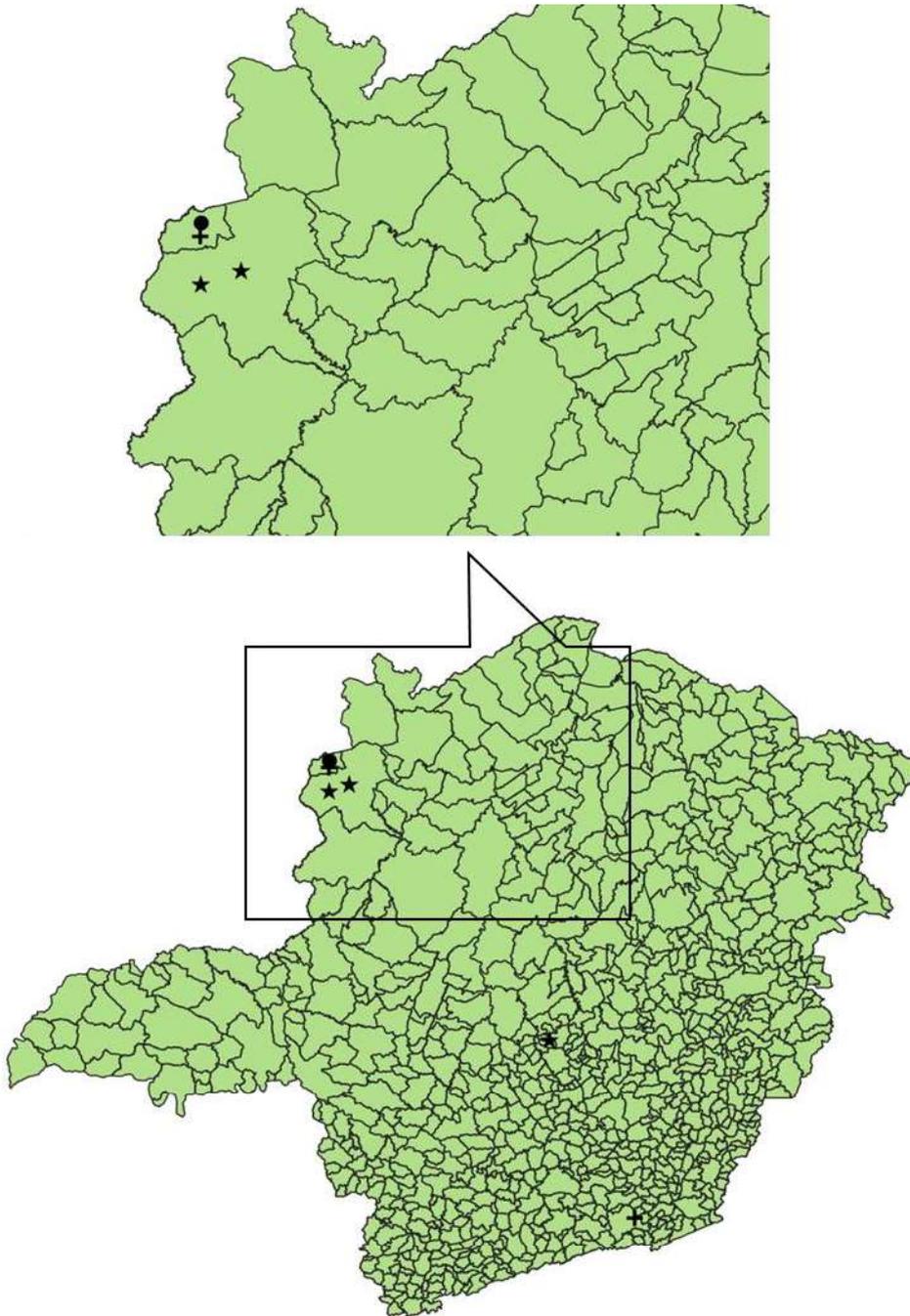
Localização dos estudos sobre *Babesia bigemina* no estado de Minas Gerais.



Localização dos estudos sobre *Babesia* spp. e *Babesia bovis* nos estados de Santa Catarina (A), Rio Grande do Sul (B), Piauí (C), Rondônia (D), Paraíba (E), Maranhão (F) e Acre (G).



Localização dos estudos sobre *Babesia* spp. e *Babesia bovis* nos estados de Bahia (H), Mato Grosso do Sul (I) e São Paulo (J).



Localização dos estudos sobre *Babesia* spp. e *Babesia bovis* no estado de Minas Gerais.

## 2.2 Artigo 2

### **Effect of *Anaplasma marginale* and *Babesia* spp. infection on first-service conception rate and hematological parameters of taurine heifers**

Natalia Machado Rahal, Gabriela Bueno Luz, Kauê Rodriguez Martins, Bernardo Garziera Gasperin, Josiane de Oliveira Feijó, André Gustavo Cabrera Dalto, Monique Tomazele Rovani, Marcio Nunes Corrêa

Manuscrito submetido à *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*

## **Effect of *Anaplasma marginale* and *Babesia* spp. infection on first-service conception rate and hematological parameters of taurine heifers**

Natalia Machado Rahal<sup>1\*</sup>; Gabriela Bueno Luz<sup>1\*</sup>; Kauê Rodriguez Martins<sup>\*</sup>; Bernardo Garziera Gasperin<sup>3\*</sup>; Josiane de Oliveira Feijó<sup>1\*</sup>; André Gustavo Cabrera Dalto<sup>2,3</sup>; Monique Tomazele Rovani<sup>2,3</sup>; Marcio Nunes Corrêa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária – Universidade Federal de Pelotas (NUPEEC-UFPel), Pelotas, RS, Brasil. <sup>\*</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, <sup>2</sup>Setor de Grandes Ruminantes, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. <sup>3</sup>Rede Fibra, Rio Grande do Sul, Brasil.

### **ABSTRACT**

This study aimed to verify the impact of *Anaplasma marginale* and *Babesia* spp. infection over first-service conception rate and hematological parameters in taurine heifers. Angus females (n=94) were enrolled in a timed artificial insemination (TAI) protocol. Blood samples with anticoagulant were collected on the first day of TAI (D-10) and on pregnancy diagnosis (D+34). Hematocrit, total plasmatic protein, erythrocyte count and hemoglobin were determined. Real time PCR (qPCR) was performed to determine *A. marginale* and *B. bovis* infection, and absolute quantification of *Babesia* spp. Heifer were grouped in pregnant (PG) and non-pregnant (NPG). Correlation analysis was performed between number of gDNA copies (CN) of *Babesia* spp. with hematological parameters. Conception rate was 47.87% (45/94), and on the first qPCR, all heifers were positive for *A. marginale* and *B. bovis*. There was no difference between groups regarding *Babesia* spp.'s CN. Significant correlation was found only between hemoglobin/erythrocyte and hemoglobin/hematocrit ( $r = 0.8082$  and  $r = 0.3009$ , respectively). Chronic infection with *A. marginale* and *Babesia* spp. was not determinant for pregnancy outcome and number of DNA copies for *B. bigemina* and *B. bovis* did not show significant correlation with hematological variables.

**Keywords:** cattle herd, timed artificial insemination, cattle tick fever, qPCR

### **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi verificar o impacto da infecção por *Anaplasma marginale* e *Babesia* spp. sobre a taxa de concepção e parâmetros hematológicos de novilhas taurinas. Fêmeas Angus (n=94) foram incluídas em protocolo de inseminação artificial (IATF). Amostras de sangue foram coletadas no primeiro dia de IATF (D-10) e no diagnóstico de gestação (D+34). Hematócrito, proteína plasmática total, eritrócitos e hemoglobina foram determinados. A qPCR foi realizada para verificar a infecção por *A. marginale* e *B. bovis* e quantificação absoluta de *Babesia* spp. As novilhas foram agrupadas em prenhes (P) e não prenhes (NP). Análise de correlação foi realizada entre o número de cópias (CN) de *Babesia* spp. e parâmetros hematológicos. A taxa de concepção foi 47,87% (45/94) e na qPCR todas as novilhas foram positivas para *A. marginale* e *B. bovis*. Não houve diferença entre os grupos em relação ao CN e correlação significativa foi encontrada apenas entre hemoglobina/eritrócito e hemoglobina/hematócrito ( $r = 0,8082$  e  $r = 0,3009$ , respectivamente). A infecção crônica por *A. marginale* e *B. bovis* não foi determinante para a concepção e o CN de *Babesia* spp. não apresentou correlação significativa com as variáveis hematológicas.

**Palavras-chave:** rebanho bovino, inseminação artificial em tempo fixo, tristeza parasitária bovina, qPCR

## Introduction

Infertility and reduced reproductive rates are mainly linked to female's maturity, nutrition, environmental stress, and health status, representing a recurrent problem in domestic ruminant production (Smith et al., 2013). Clinical course of many infectious tick-borne diseases can directly and indirectly affect productive and reproductive performances of these animals, causing major financial loss for farmers throughout Brazil (Barbieri et al., 2016).

One of the diseases that impact livestock is cattle tick fever (TF), a diseases complex, caused by *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and/or *Anaplasma marginale*, significantly impacting herds in Southern Brazil (Lucena et al., 2010). Its occurrence is directly related to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (cattle tick) distribution, and has an estimated economic impact of US\$ 3.24 billion attributable to production losses (Grisi et al., 2014). Although *R. microplus* is the primary vector for these agents, tabanids, and iatrogenic transmission may also be responsible for the disease's transmission (Kocan et al., 2010; Palmer & Clothier, 2015; Zaugg, 2015). Animals from tick-free or enzootic instability areas are highly susceptible to these infections and have high morbidity rates, presenting anemia, fever, jaundice, weight loss and death. Cattle recovering from acute phase remains persistently infected, with low levels of parasitemia, perpetuating the presence of these infectious agents in the herd (Kocan et al., 2010).

It is known that severe anemia caused by TF results in hypoxia, which can lead to tissue hypoxia and subsequent abortion (Givens & Marley, 2008). Additionally, transplacental infection of *Babesia* spp. and *A. marginale* directly affect fetuses' organs causing splenomegaly, hemorrhages, and neurological damage resulting in fetal loss, stillbirths, and neonatal death (Costa et al., 2016; Henker et al., 2020). However, the effect of TF on fertility, embryonic development and early stages of pregnancy is not yet known.

In recent years, some studies have been conducted using quantitative molecular techniques. Real-time PCR (qPCR) is a more sensitive diagnostic tool, capable of providing specific data on the number of DNA copies of parasites in different samples. Through these detailed data, it is possible to analyze the relationship between the intensity of host infection, correlating with the number of vectors or its infection intensity and, also, how cattle's health is affected according to fluctuations on number of DNA copies (Martins et al., 2020; Giglioti et al., 2021; Garcia et al., 2022).

Thus, we aimed to verify the impact of *Anaplasma marginale* and *Babesia* spp. infection over first-service conception rate after timed artificial insemination (TAI) and hematological parameters in Angus heifers (*Bos taurus taurus*).

## Material and Methods

### *Animals, reproductive management, and pregnancy diagnosis*

Angus heifers (n=94) were selected for estrus synchronization protocol in November 2019. The females were maintained in an extensive system of native pasture, located in the municipality of Charqueadas, Rio Grande do Sul, Brazil (29°58'42.1"S, 51°33'28.2"W). Inclusion criteria for TAI were age ( $\geq 24$  months), weight (65% of the adult weight for the breed), and body condition score [BCS ( $\geq 2.5$ )]. The selected heifers had an average weight of  $357.8 \text{ kg} \pm 25.4$  and median BCS of 3 [max: 4; min: 2; scale from 1 (thin) to 5 (obese)]. During animal handling, vaginal mucosal color was assessed and classified (pale, pink, hyperemic, or icteric), and subjective evaluation of tick infestation was made by visualization of ticks (from 4.5 to 7 mm) on both sides of each heifer (adapted from Wharton & Utech, 1970), categorizing on a scale of 0 to 4 (0 – no ticks; 1 – low infestation; 2 – mild infestation; 3 – high infestation; 4 intense infestation). All subjective evaluation were made by the same examiner. Study protocol was approved by the Ethics Committee (CEUA/IFFAR 5550010518).

Heifers were subjected to an ovulation synchronization protocol with an intravaginal progesterone-releasing device (1.25 g Biprogest<sup>®</sup>, Bimeda, Brazil) along with an i.m. administration of 2 mg estradiol benzoate (EB; Sincroben<sup>®</sup>, Bimeda, Brazil) 10 days before TAI (D-10). The device was removed on D-2 and sodium cloprostenol (526  $\mu\text{g}$ ; Clocio<sup>®</sup>, Bimeda, Brazil) was administered i.m. On D-1, EB (1 mg; Sincroben<sup>®</sup>, Bimeda, Brazil) was injected i.m., and on day 0 (D0) TAI was performed. Pregnancy diagnosis was performed using ultrasound on day 34 (D+34). After handling and sampling on D-10, heifers were treated with Colosso FC30 (Ourofino Saude Animal, Brazil) using an immersion bath, as part of the farm's procedure.

### *Sample collection and processing*

On D-10 and D+34, blood samples were collected from all animals by coccygeal vein puncture into 4 mL vacuum tubes with EDTA, and were immediately placed in a cool box and transported to the laboratory within 12 hours. Subsequently, samples were used to determine hematocrit, using capillary tubes, and centrifuging for 5 min at  $2,650 \times g$  in digital microhematocrit centrifuge (Benfer, São Paulo, Brazil). The results were determined with a micro-hematocrit reader, and total plasmatic proteins was obtained using a portable refractometer (ITREF200, Instrutemp, Sao Paulo, Brazil). An automatic hematology analyzer

(BC-2800Vet, Mindray, Brazil) was used to evaluate erythrocyte count and hemoglobin concentration.

For direct parasite detection, blood smears of all samples were made, stained with Panotico Rapido (LaborClin, Paraná, Brazil), and visualized on a microscope (Nikon Eclipse E200, Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan). Animals were considered as negative, positive for *Babesia* spp., positive for *A. marginale* or positive for both. In addition, a blood aliquot of 1 mL was separated from EDTA tube, placed in a 1.5 mL microtube, and stored at -20°C for subsequent DNA extraction and PCR analysis.

#### *Genomic DNA extraction and real time PCR (qPCR)*

Total genomic DNA (gDNA) was extracted from D-10 samples, using ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, USA) according to manufacturer's instructions. Samples' DNA quantity and purity (260/280 nm ratio) were evaluated by spectrophotometry using NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, USA). Initially, a standard two-step real time PCR (qPCR) was performed using GoTaq qPCR Master Mix (Promega) for *A. marginale* (F - 5' – AAGGCGAGGAGCTTTATTAAG – 3'; R - 5' - CTACTGCCTCACAAGGACGA - 3') and *B. Bovis* (F - 5' - TGTTCTGGAAGCGTTGATTC - 3'; R - 5' – AGCGTGAAAATAACGCATTGC – 3'), using primers described by Bacanelli et al. (2014) and Buling et al. (2007), respectively. Final well volume was 20 µL, with initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec and annealing/extension at 58°C for 30 sec. To ensure viability of extracted gDNA, qPCR was also performed based on the endogenous mammalian *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene (F – 5' – GATTGTCAGCAATGCCTCCT – 3'; R – 5' – GGTCATAAGTCCCTCCACGA – 3'). Melting curves were verified to guarantee the identity of the result and the amplicons were sequenced and submitted to homology analysis by blast software (all with identity greater than 96% for target genes). Samples were analyzed in duplicate, using the StepOne Plus Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Samples positive for *B. bovis* in real-time PCR were quantified for *B. bigemina* e *B. bovis*.

#### *Absolute quantification of Babesia spp.*

To determine *B. bigemina* and *B. bovis* infection levels, species-specific primers (Buling et al., 2007) and standard curves (Giglioti et al., 2016; 2017) targeting mitochondrial cytochrome b gene for *B. bigemina* (*cBisg*) and *B. bovis* (*cBosg*) were used (Table 1).

Quantification of DNA levels were carried in CFX Opus 96™ Real-Time PCR machine and data were obtained from Bio-Rad CFX Maestro 2.3 software (Bio-Rad Laboratories, 2021). Final well volume was 10 µL, using 5 µL of iTaq, 0.5 µL of F primer (10 mM), 0.5 µL of R primer (10mM), 2 µL of sterile ultra-pure water (Nuclease-Free Water, Promega®, São Paulo, Brazil), and 2 µL of sample, diluted for a final concentration of 50 ng/µL of DNA. Run method comprised an activation cycle of iTaq DNA polymerase at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 45 s and an annealing/extension cycle at 60 °C for 1 min.

Using starting quantity (SQ) data from equipment's software, number of DNA copies (NC) was calculated as described by Ke et al. (2006),  $CN = [6.022 \times 10^{23} \text{ (copies/mol)} \times \text{concentration (g/mol)}] / \text{molecular mass (g/L)}$ , where  $6.022 \times 10^{23}$  is Avogadro's constant, and the molecular mass is the average molecular weight of double-stranded DNA ( $330 \times 2$ ) multiplied by the size of the cloned fragment (Ke et al., 2006).

The calibration curve was constructed using gBlocks® sequences (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, USA) for cytochrome b gene for *B. bigemina* and *B. bovis*, and a preliminary test was performed using serial dilution ranging from  $10^{-1}$  to  $10^{-15}$ , positive control sample and randomly selected samples from heifers. After the initial tests, optimal standard curves ranged from  $10^{-7}$  to  $10^{-13}$  ng/µL for *B. bigemina*, and from  $10^{-3}$  to  $10^{-9}$  ng/µL for *B. bovis* (Supplementary file 1). Samples of one bovine infected with *B. bigemina* and one with *B. bovis*, previously confirmed with blood smear and conventional PCR according to Buling et al. (2007), were used as positive control, and negative control was nuclease free water. All samples, including controls and gBlocks®, were analyzed in duplicate and samples that differed regarding the duplicate (cycle quantification's standard deviation > 0.5) were re-analyzed. The guidelines of "Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments" - MIQE (Bustin et al., 2009) were followed.

### *Statistical analysis*

Conception rate was calculated by dividing the number of pregnant heifers by the number of inseminated heifers, multiplying by 100. Data were analyzed considering pregnancy outcome as response variable and data normality was verified through Shapiro Wilk's test. Tukey's test was performed to compare hematocrit, total plasmatic protein, and hematological parameters' means between pregnant (PG) and non-pregnant (NPG) groups. As for number of gDNA copies (CN) for *Babesia* spp., Wilcoxon's test was used. Comparison of vaginal mucosal color and tick infestation between groups was made using Fisher's exact test. Nonparametric correlation test was performed to analyze the relationship CN for *B. bigemina* and *B. bovis* with

hematological parameters, regardless of pregnancy outcome. All statistical analyses were performed using JMP Pro 14 (SAS Institute Inc., 2018), and significance was achieved when  $P < 0.05$  and tendency when  $0.05 < P < 0.1$ .

## Results and Discussion

A total of 94 heifers were inseminated and conception rate was 47.87% (45/94), as expected for this breed and category (Sánchez-Castro et al., 2020). None of the animals presented pale or icteric mucosa, and there was no difference between groups regarding the color of the vaginal mucosa.

Only one of the pregnant heifers presented tick infestation (score 1 - low) on D-10, and 19 heifers did not present ticks on D+34 (8 PG and 11 NPG), while eight had mild infestation (score 2; 5 PG and 3 NPG). There was no intense tick infestation, neither statistical difference between PG and NPG heifers. Low tick count could be explained by the fact that the experimental period occurred in the spring. In the Rio Grande do Sul state, there are distinct weather and season throughout the year. From July to September (winter season) there is no development of tick's life cycle, and from October to December tick population (1<sup>st</sup> generation) is still low (Santos et al., 2019).

As expected, due to the absence of animals with clinical signs for TF, neither *A. marginale* nor *Babesia* spp. was visualized in microscopic evaluation of blood smears. On D-10, NPG mean hemoglobin concentration was higher ( $P = 0.04$ ), and hematocrit, and erythrocyte tended to be higher ( $P = 0.06$  and  $P = 0.09$ , respectively; Figure 1). However, hematological parameters for both groups were found within range on D-10 and D+34, and no other differences were found. Higher hematocrit, hemoglobin and erythrocyte means for NPG on D-10 were probably due to individual physiological factors, as hematological parameters are influenced by many factors as breed, age, sex, seasonal variations, pregnancy, health, and nutrition status (Mohammed et al., 2007).

Administration of hormones can increase total plasmatic protein, due to their anabolic effects (Eckersall, 2008), explaining higher means of plasmatic protein for both groups in D+34. Other causes for higher plasmatic protein may occur because of the stress of handling for the TAI protocol and pregnancy diagnosis, promoting an inflammatory reaction (Cooke et al., 2012) or increased intestinal absorption of protein, due to changes in heifers' diet (Law et al., 2009).

Since all heifers were positive for *A. marginale* and *B. bovis* in the first qPCR, it was not possible to determine whether infection interfered on pregnancy outcome at first-service.

Further studies in herds where it is possible to have a control group (negative animals), or which have frequent outbreaks, with clinical manifestation of babesiosis and anaplasmosis, are necessary to enable a better understanding of the influence of these infections on fertility.

In the analysis of absolute quantification, six animals were negative for *B. bigemina* (four PG and two NPG) and two were negative for *B. bovis*, one from each group. In general, a higher number of *B. bovis* DNA copies were found, and CN for *B. bigemina* tended to be higher on NPG (Table 2).

Significant positive correlation coefficients were found between hemoglobin/erythrocyte ( $r = 0.8082$ ;  $P < 0.0001$ ) and hemoglobin/hematocrit ( $r = 0.3009$ ;  $P = 0.0049$ ), while hematocrit tended to correlate positively with erythrocyte ( $r = 0.1862$ ;  $P = 0.086$ ) (Table 3). No significant correlation was found between *B. bigemina* and *B. bovis* CN and hematological variables. Higher *B. bovis* NC was also found on cows and calves of different beef breeds in the state of São Paulo, but no correlation was observed between CN of *B. bovis* and *B. bigemina* with the number of ticks found in the host (Giglioti et al., 2016). Instead, tick infection levels showed a positive correlation with the CN of these parasites, indicating that the variation of parasitemia levels in the host depends not only on the presence of ticks, but on the infection load of the vectors (Giglioti et al., 2018), and host's immunological response (Palmer & Clothier, 2015; Zaugg, 2015).

No other studies looking for the relationship between erythrocyte count and hemoglobin concentration with qPCR data for *Babesia* spp. of Angus females were found. When investigating cattle with different breeds and ages, Bilhassi et al. (2014) found only a significant negative correlation (-0.29) CN of *B. bovis* and hematocrit for Nellore cows, while the other coefficients were close to zero. In this study, the coefficient between these same variables was -0.13, but also considered insignificant. Even in cattle with anemia (hematocrit < 25%), no correlation of hematocrit was observed with the number of DNA copies of *A. marginale* (Ramos et al., 2019). Although the absolute quantification for *A. marginale* was not performed in this study, the data referring to the copies of *B. bigemina* and *B. bovis* also showed no significant correlation with the other hematological variables.

Also, although most of the Brazilian territory is considered endemic for TF agents, in Rio Grande do Sul there are several areas of enzootic instability (Santos et al., 2019). Thus, persistently infected animals, identified by molecular techniques, are at risk of increased parasitemia and recurrence of acute infection, increasing economic losses (Kocan et al., 2010). Pregnant females present a bigger risk as these parasites can be transmitted to the fetus, causing pregnancy loss, and stillbirth (Henker et al., 2020), and it is important to determine if prevention

strategies for stressful periods for cows is necessary (Silva and Fonseca, 2014), according to the reality of each herd.

## Conclusions

Due to high occurrence of *A. marginale* and *Babesia* spp. infection among heifers in this study, it was not possible to verify its effect on first-service conception rate. Nonetheless, it is possible to affirm that chronic infection of TF agents was not determinant for pregnancy outcome. The number of DNA copies for *B. bigemina* and *B. bovis* was not different between groups and showed no significant correlation with hematocrit, erythrocyte count and hemoglobin concentration.

## References

- BACANELLI, G.M.; RAMOS, C.A.; ARAÚJO, F.R. Molecular diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle: quantitative evaluation of a real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) based on msp5 gene. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.34, n.1, p.29-33, 2014.
- BARBIERI, J. M., BLANCO, Y. A. C, BRUHN, F. R. P., & GUIMARÃES, A. M. Seroprevalence of *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale*, and *Babesia bovis* in dairy cattle. *Ciência Animal Brasileira*, v.17, p.564-573, 2016.
- BILHASSI, T. B., OLIVEIRA, H. N., IBELLI, A. M., GIGLIOTI, R., REGITANO, L. C., OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G., BRESSANI, F. A., MALAGÓ JR., W., RESENDE, F. D. & OLIVEIRA, M. C. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, v.5, n. 3, p.234-238, 2014.
- BULING, A. CRIADO-FORNELIO, A., ASENZO, G., BENITEZ, D., BARBACARRETERO, J. C., FORIN-CHRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Veterinary parasitology*, v.147, n.1-2, p.16-25, 2007.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 55: 611-22, 2009.
- COOKE, R.F., BOHNERT, D.W., CAPPELLOZZA, B.I., MUELLER, C.J. & DELCURTO, T., Effects of temperament and acclimation to handling on reproductive performance of *Bos taurus* beef females. *Journal of Animal Science*, v.90, n. 10, p.3547-3555, 2012.
- COSTA, S. C. L., DE MAGALHÃES, V. C. S., DE OLIVEIRA, U. V., CARVALHO, F. S., DE ALMEIDA, C. P., MACHADO, R. Z., & MUNHOZ, A. D. Transplacental transmission of

bovine tick-borne pathogens: frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic stability in the northeast of Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, v.7, n.2, p.270-275, 2016.

ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J., HARVEY, J. W., BRUSS, M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic press, chapter 5, p.117-155, 2008.

GARCIA, A. B., JUSI, M. M. G., FRESCHI, C. R., RAMOS, I. A. S., MENDES, N. S., DO AMARAL, R. B., GONÇALVES, L. R., ANDRÉ, M. R., & MACHADO, R. Z. High genetic diversity and superinfection by *Anaplasma marginale* strains in naturally infected Angus beef cattle during a clinical anaplasmosis outbreak in southeastern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v.13, n. 1, p.101829, 2022.

GIGLIOTI, R., DE OLIVEIRA, H.N., OKINO, C.H., DE SENA OLIVEIRA, M.C. qPCR estimates of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels in beef cattle and *Rhipicephalus microplus* larvae. *Exp Appl Acarol* v. 75, p.235–240, 2018.

GIGLIOTI, R., OLIVEIRA, H.N., IBELLI, A.M.G., BILHASSI, T.B., N'EO, T.A., SANTANA, C.H., RABELO, M.D., MACHADO, R.Z., CHAGAS, A.C.S., OLIVEIRA, M.C.S. Neither quantification by qPCR nor quantitative Elisa can be used to discriminate Angus cattle for resistance/susceptibility to *Babesia bovis*. *Ticks Tick-borne Dis.* v.8, n. 3, p. 335–340, 2017.

GIGLIOTI, R., OKINO, C.H., AZEVEDO, B.T., WEDY, B.C.R., GUTMANIS, G., VERÍSSIMO, C.J., KATIKI, L.M., FILHO, A.E.V., DE OLIVEIRA, H.N., OLIVEIRA, M.C. DE S. Semi-quantitative evaluation of *Babesia bovis* and *B. bigemina* infection levels estimated by HRM analysis. *Ticks and Tick-borne Diseases* v.12, p.101753, 2021.

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 and Tick-borne Diseases* v.7, p.657–662, 2016.

GIVENS, M.D., & MARLEY, M.S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, v.70, p.270-285, 2008.

GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.; BARROS, A.T. Reassessment of the potential economic impact of the cattle parasites in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, v.32, n.2, p.150-156, 2014.

- HENKER, L. C., LORENZETT, M. P., FAGUNDES-MOREIRA, R., DALTO, A. G. C., SONNE, L., DRIEMEIER, D., SOARES, J. F. & PAVARINI, S. P. Bovine abortion, stillbirth and neonatal death associated with *Babesia bovis* and *Anaplasma* sp. infections in southern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 11, n.4, p. 101443, 2020.
- KE, G. M., CHENG, H. L., KE, L. Y., JI, W. T., CHULU, J. L., LIAO, M. H., et al. Development of a quantitative Light cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. *J Virol Methods*. 133: 6– 13. 2006.
- KOCAN, K. M., DE LA FUENTE, J., STEP, D. L., BLOUIN, E. F., COETZEE, J. F., SIMPSON, K. M., GENOVA, S. G. & BOILEAU, M. J. Current challenges of the management and epidemiology of bovine anaplasmosis. *The bovine practitioner*, p.93-102, 2010.
- LAW, R.A., YOUNG, F.J., PATTERSON, D.C., KILPATRICK, D.J., WYLIE, A.R.G. & MAYNE, C.S. Effect of dietary protein content on animal production and blood metabolites of dairy cows during lactation. *Journal of Dairy Science*, v.92, n.3, p.1001-1012, 2009.
- LUCENA, R.B. PIEREZA, F., KOMMERS, G. D., IRIGOYEN, L. F., FIGHERA, R. A., & BARROS, C. S. L. Bovine diseases in southern Brazil: 6,706 cases. *Brazilian Veterinary Research*, v.30, p.428-434, 2010.
- MARTINS, K.R., GARCIA, M.V., BONATTE-JUNIOR, P., DUARTE, P.O., DE HIGA, L.O.S., CSORDAS, B.G., BARROS, J.C., ANDREOTTI, R. Correlation between *Rhipicephalus microplus* ticks and *Anaplasma marginale* infection in various cattle breeds in Brazil. *Exp Appl Acarol* v. 81, p.585–598, 2020.
- MOHAMMED, A. K., MOHAMMED, G. and AKEREJOLA, O. O. Haematological and serum biochemical changes in Bunaji work bulls after farmland ridging exercise in Kaduna State, Nigeria. *J. Anim. Vet. Adv.*, v. 6, p. 576-579, 2007.
- PALMER, G. H., & CLOTHIER, K. A. Bovine Anaplasmosis. 2015. In: Smith, B. P. *Large Animal Internal Medicine*, 5th ed., Mosby, cap. 37, 1054-1056.
- RAMOS, I. A. S., HERRERA, H. M., DE JESUS FERNANDES, S., DO AMARAL, R. B., DE SOUZA ZANATTO, D. C., DA SILVA, T. M. V., HORTE, B. L. S., CAMPOS, J. B. V., ALVES, J. V. A., MACEDO, G. C. MACHADO, R. Z., & ANDRÉ, M. R. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in beef cattle in the Brazilian Pantanal. *Ticks and tick-borne diseases*, v.10, n. 4, p.805-814, 2019.
- SÁNCHEZ-CASTRO, M. A., THOMAS, M. G., ENNS, R. M., & SPEIDEL, S. E. Genetic prediction for first-service conception rate in Angus heifers using a random regression model. *Translational Animal Science*, v.4(Supplement 1), S43-S47, 2020.

SANTOS, L. R., GASPAR, E. B., BENAVIDES, M. V., & TRENTIN, G. Bovine Parasitic Sadness - Current control measures. Embrapa Cattle-Cut Chapter in scientific book (ALICE), 2019.

SILVA, J. B. & FONSECA, A. H. Risk factors for anaplasmosis in dairy cows during the parturition. Tropical Animal Health and Production, v. 46, n. 2, p. 461-465, 2014.

SMITH MF, POHLER KG, PERRY GA, PATTERSON D. Physiological factors that affect pregnancy rate to artificial insemination in beef cattle. Proc Applied Reprod Strat Beef Cattle. Oct 15:27-45, 2013

WHARTON, R. H. & UTECH, K. B. W. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Cassini) (Ixodidae) to the assessment of the tick numbers on cattle. J Aust Entomol Soc 9(3), 171-182, 1970.

ZAUGG, J. L. Babesiosis. 2015. In: Smith, B. P. Large Animal Internal Medicine, 5th ed., Mosby, cap. 37, 1157-1159.

Table 1. *Primers and probes* used for qPCR for absolute quantification of *Babesia bigemina* and *B. bovis*

Figure 1. Hematological parameters of angus heifers with pregnant (PG) and non-pregnant (NPG) on the first day (D-10) and 34 days after the timed artificial insemination protocol (TAI). Hematocrit observed in D-10 (A) and D+34 (B), total plasma protein in D-10 (C) and D+34 (D), number of erythrocytes in D-10 (E) and D+34 (F) and hemoglobin concentration in D-10 (G) and D+34 (H).

<sup>+</sup> Statistical tendency ( $0.05 < P < 0.1$ ) on Tukey's test

<sup>\*</sup> Statistical significance ( $P < 0.05$ ) on Tukey's test

Table 2. Number of DNA copies (CN) of *Babesia bigemina* and *B. bovis* (mean  $\pm$  SE) of pregnant (PG) and non-pregnant (NPG) Aberdeen Angus heifers on the first day (D-10) of fixed timed artificial insemination protocol

<sup>+</sup> Statistical tendency ( $0.05 < P < 0.1$ ) on Wilcoxon's test

Table 3. Correlation matrix of hematological parameters and number of *Babesia bigemina* and *B. bovis* copies of Aberdeen Angus heifers before timed artificial insemination

<sup>1</sup> Spearman's  $\rho$

<sup>2</sup> Pearson's  $r$

<sup>+</sup>  $0.05 < P < 0.1$

<sup>\*</sup>  $P < 0.05$

<sup>\*\*</sup>  $P < 0.0001$

**TABLE 1**

Type (5' – 3')	<i>Babesia bigemina</i>	<i>Babesia bovis</i>
Forward primer	TGTTCCAGGAGATGTTGATTC	GGATTGTGGTACTCAAGC AGATA
Probe	/56- FAMQCGAGTGTGT/ZEN/TATCAGAG TATTA ACTGAGGT/3IABkFQ/	/56- FAMQACCATGGTC/ZEN/A TGGTATTCTGGAATGGT/3I ABkFQ/
Reverse primer	AGCATGGAAATAACGAAGTGC	CCGTAAGGAAGAACATAA CCTAAGA

FIGURE 1

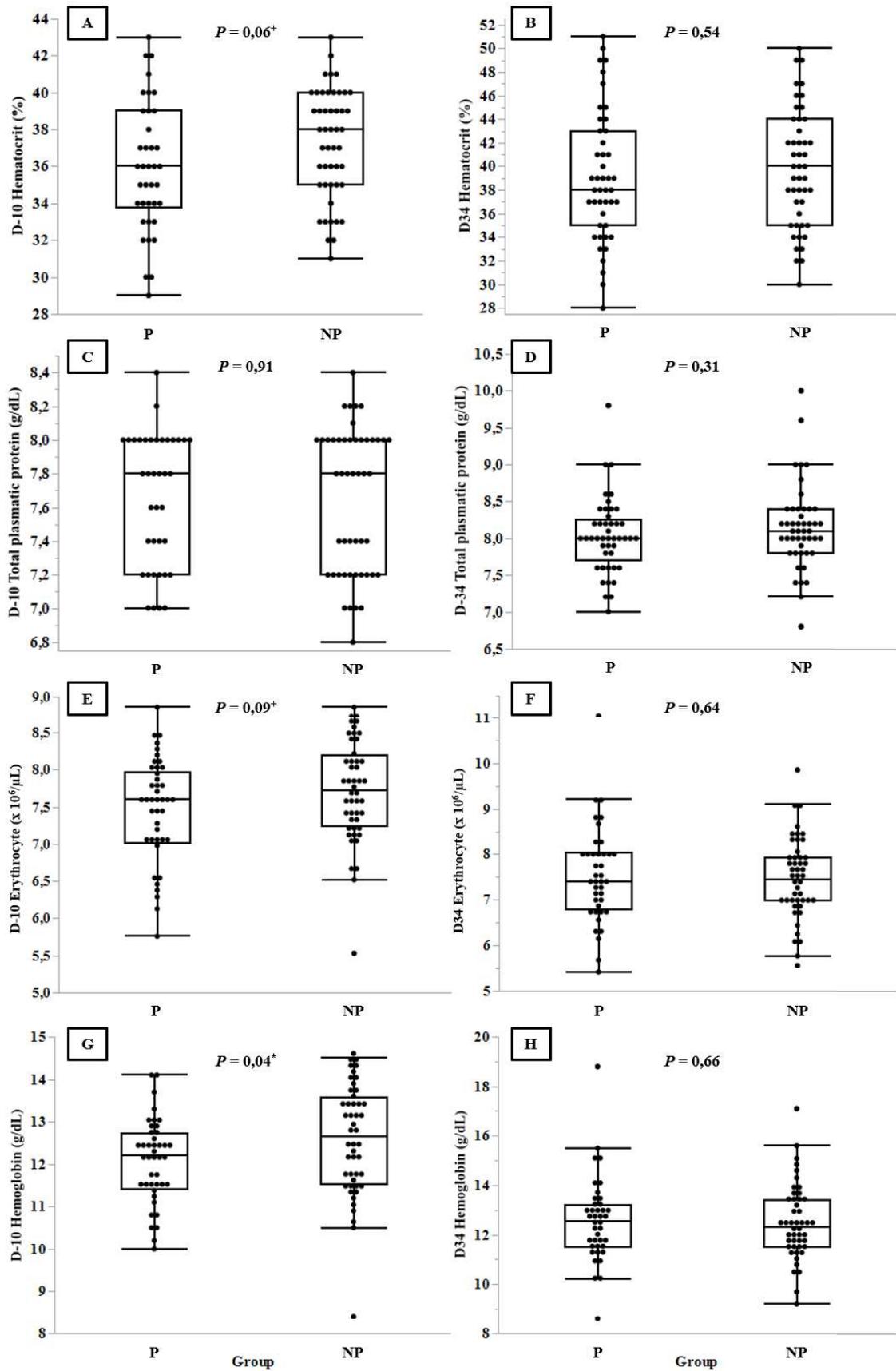


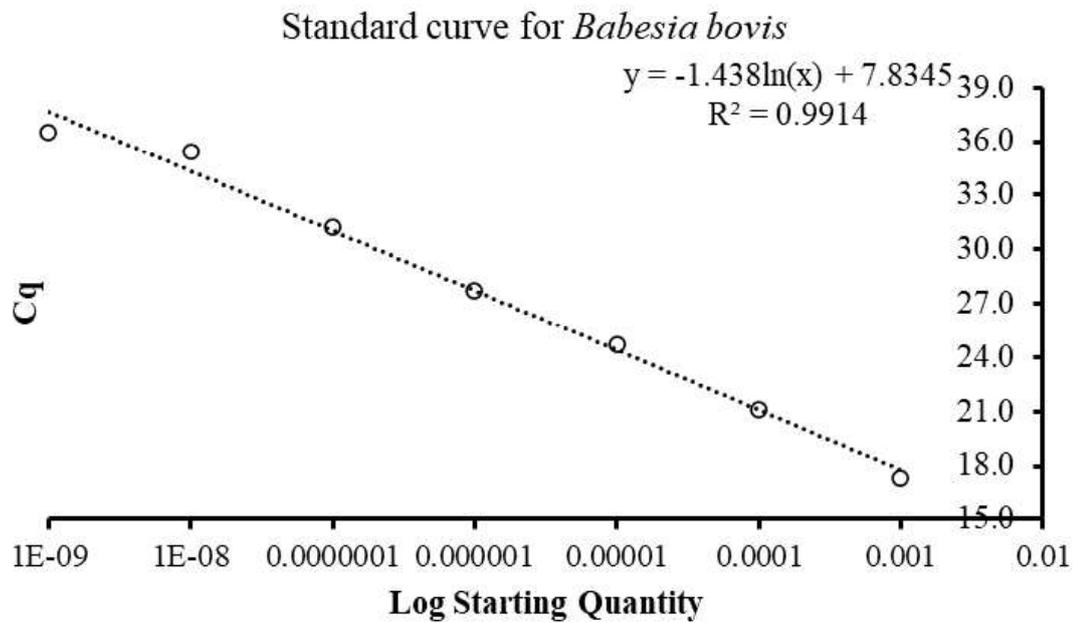
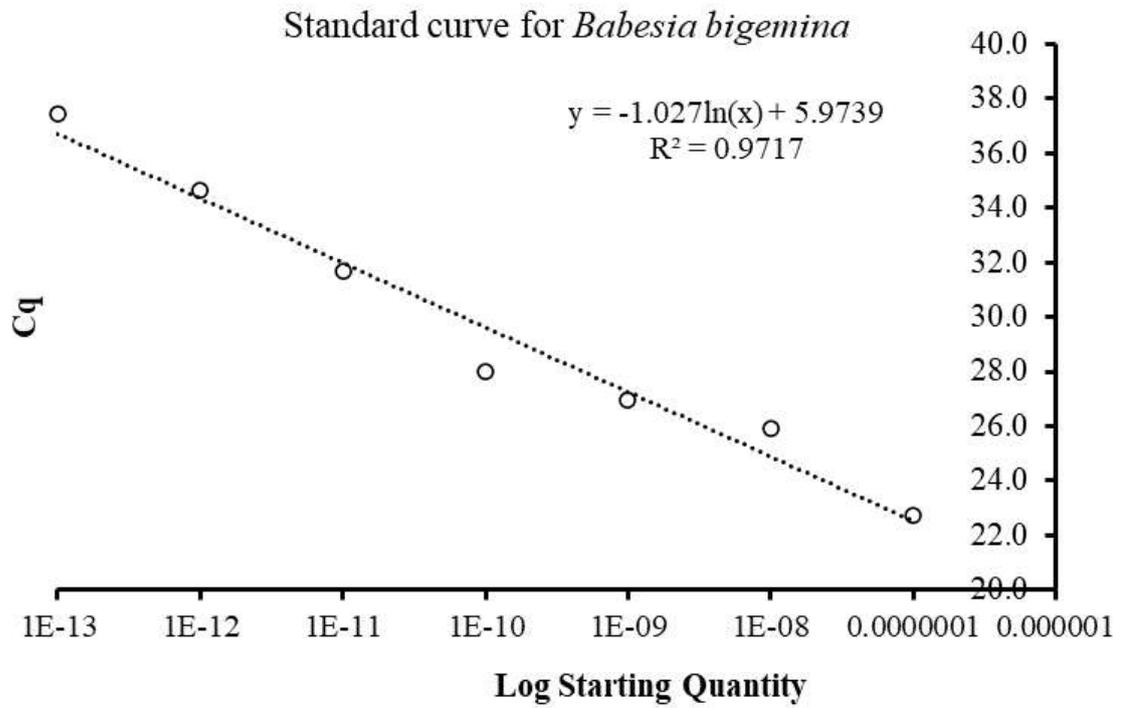
TABLE 2

Parameters	PG ( $\bar{X} \pm SE$ )	NPG ( $\bar{X} \pm SE$ )	P
CN <i>B. bigemina</i> (copies/ $\mu$ L)	0.015 $\pm$ 0.005	0.037 $\pm$ 0.16	0.068 <sup>+</sup>
CN <i>B. bovis</i> (copies/ $\mu$ L)	2,413 $\pm$ 614.8	1,419 $\pm$ 333.4	0.11

TABLE 3

Variables	CN <i>B. bigemina</i>	CN <i>B. bovis</i>	Hematocrit	Total plasmatic protein	Erythrocyte	Hemoglobin
CN <i>B. bigemina</i>	1.000 <sup>1</sup>	0.0773 <sup>1</sup>	0.0691 <sup>1</sup>	-0.1998 <sup>1</sup>	0.0993 <sup>1</sup>	0.0584 <sup>1</sup>
CN <i>B. bovis</i>		1.000 <sup>1</sup>	-0.1318 <sup>1</sup>	0.0561 <sup>1</sup>	0.0832 <sup>1</sup>	0.0403 <sup>1</sup>
Hematocrit			1.000 <sup>2</sup>	0.1221 <sup>2</sup>	0.1862 <sup>2+</sup>	0.3009 <sup>2*</sup>
Total plasmatic protein				1.000 <sup>2</sup>	0.1175 <sup>2</sup>	0.1734 <sup>2</sup>
Erythrocyte					1.000 <sup>2</sup>	0.8082 <sup>2**</sup>
Hemoglobin						1.000 <sup>2</sup>

## Supplementary file 1



### **3 Patente**

Patente em processamento pelo Escritório de Propriedade Intelectual, Transferência de Tecnologia e Empreendedorismo (EPITTE/UFPel).

Autores: André Ricardo Fajardo; Eduardo Schmitt; Francisco Augusto Burkert Del Pino; Josiane de Oliveira Feijó; Marcio Nunes Corrêa; Natália Machado Rahal; Rubens Alves Pereira.

<sup>1</sup>Os dados referentes aos ativos que dessa patente foram omitidos devido ao processo em andamento junto ao Escritório de Propriedade Intelectual, Transferência de Tecnologia e Empreendedorismo (EPITTE/UFPel).

#### 4 Considerações Finais

A ocorrência molecular de *A. marginale* e *Babesia* spp. no Brasil se mostrou variada, de 7,32% a 98,78%, nas regiões onde foi possível se obter dados. Contudo, não foram encontrados trabalhos em estados com rebanhos bovinos de tamanho significativo, como Mato Grosso e Pará, por exemplo. Os resultados obtidos com o estudo de revisão sistemática demonstram que ainda existem áreas a serem exploradas, principalmente no que diz à quantificação dos níveis de infecção em animais reservatório e de que forma a infecção crônica impacta nos índices produtivos das categorias animais. Havendo oportunidade também de estudos que avaliem a eficácia dos tratamentos e prevenção comumente utilizados no Brasil através da quantificação da parasitemia antes e após os protocolos.

Foi possível observar que a baixa parasitemia de *A. marginale* e *Babesia* spp., sem comprometimento das variáveis hematológicas, não foram determinantes para a taxa de concepção no primeiro serviço das novilhas Angus. Possivelmente, pesquisas realizadas em rebanhos com maior ocorrência de doença clínica, ou em rebanhos leiteiros de alta produção, onde os animais são metabolicamente desafiados, possam elucidar melhor a influência de agentes da TPB nos parâmetros produtivos e reprodutivos.

Através do trabalho para desenvolvimento do produto, foi possível sair de um TRL (“technology readiness level”) 1 (ideia) para TRL 5 (teste em escala piloto). A opção de uma formulação com lenta e ação prolongada para prevenção da TPB, como apresentado nessa tese, representa uma opção mais vantajosa. Há geração de valor para os produtores, pela redução de manejo e com menor número de aplicações. Há poucas opções de produtos de liberação prolongada para prevenção da TPB e estes não possuem padrão de liberação inicial controlada, aumentando o potencial de toxicidade dependendo da dose utilizada ou do estado do animal. As tecnologias empregadas em alguns desses produtos utilizam compostos caros, elevando custo de produção e preço para o consumidor final, enquanto a emulsão desenvolvida possui componentes de baixo custo, com potencial para gerar maior retorno econômico. Ainda, o veículo aqui apresentado é passível de associação a diferentes princípios e moléculas, sendo mais interessante para as indústrias e para o mercado.

## Referências

- ALBERTON, L. R.; ORLANDINI, C. F.; ZAMPIERI, T. M.; NAKAMURA, A.Y.; GONÇALVES, D. D.; PIAU JÚNIOR, R. et al. Eficácia do dipropionato de imidocarb, da enrofloxacina e do cloridrato de oxitetraciclina no tratamento de bovinos naturalmente infectados por *Anaplasma marginale*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.4, p.1056–62, 2015.
- AL-HOSARY, A. A. T. Comparison between conventional and molecular methods for diagnosis of bovine babesiosis (*Babesia bovis* infection) in tick infested cattle in upper Egypt. **Journal of Parasitic Diseases** v.41, p.243–246, 2017.
- ALMAZAN, C.; TIPACAMU, G. A.; RODRIGUEZ, S.; MOSQUEDA, J.; LEON, A. P. Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v.23, n.8, p.1535–51, 2018.
- ALVAREZ, J. A.; ROJAS, C.; FIGUEROA, J. V. Diagnostic Tools for the Identification of *Babesia* sp. in Persistently Infected Cattle. **Pathogens**, v.8, n.3, p.143, 2019.
- AMORIM, L. S.; WENCESLAU, A. A.; CARVALHO, F. S.; CARNEIRO, P. L. S.; ALBUQUERQUE, G. R. Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, p.328–36, 2014.
- ANDREOTTI, R.; BARROS, J. C.; GARCIA, M. V.; RODRIGUES, V. S.; HIGA, L. O. S.; DUARTE, P. O. et al. Cattle tick infestation in Brangus cattle raised with Nellore in central Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.39, n.3, p.1099–114, 2018.
- AUBRY, P.; GEALE, D. W. A Review of Bovine Anaplasmosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.58, n.1, p.1–30, 2011.
- BACANELLI, G. M.; RAMOS, C. A.; ARAÚJO, F. R. Molecular diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle: quantitative evaluation of a real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) based on msp5 gene. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.1, p.29-33, 2014.
- BAHIA, M.; SILVA, J. S.; GONTIJO, I. S.; CORDEIRO, M. D.; SANTOS, P. N.; SILVA, C. B. et al. Characterization of cattle tick fever in calves from the northwestern region of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.29, n.1, p. e017119, 2020.
- BARBIERI, J. M.; BLANCO, Y. A. C.; BRUHN, F. R. P.; GUIMARÃES, A. M. Seroprevalence of *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale*, and *Babesia bovis* in dairy cattle. **Ciência Animal Brasileira**, v.17, p.564-573, 2016.

BARROS, G. S. C.; CASTRO, N. R.; MACHADO, G. C.; ALMEIDA, F. M. S.; ALMEIDA, A. N. **Boletim Mercado de Trabalho do Agronegócio Brasileiro**. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA), 2022.

BASTOS, T. S. A.; CRUVINEL, L. B.; FERREIRA, L. L.; NICARETTA, J. E.; COUTO, L. F. M.; ZAPA, D. M. B. et al. Delayed reduction of *Anaplasma marginale* parasitemia and packed cell volume normalization despite prolonged enrofloxacin treatment of cattle co-infected with *Trypanosoma vivax*. **Parasitology Research**, v.120, n.8, p.2929–37, 2021.

BILHASSI, T. B.; OLIVEIRA, H. N.; IBELLI, A. M. G.; GIGLIOTI, R.; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. et al. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, n.3, p.234–8, 2014.

BRITO, L. G.; OLIVEIRA, M. C. S.; ROCHA, R. B.; SILVA NETTO, F. G.; MARIM, A. D.; SOUZA, G. C. R. et al. *Anaplasma marginale* infection in cattle from southwestern Amazonia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.249–54, 2010.

BRITO, L. G.; ROCHA, R. B.; BARBIERI, F. S.; RIBEIRO, E. S.; VENDRAMI, F. B.; SOUZA, G. C. R. et al. *Babesia bovis* infection in cattle in the southwestern Brazilian Amazon. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.4, n.1, p.78–82, 2013.

BRITO, L. G.; BARBIERI, F.D.S.; FERREIRA, T. A. A.; CARNEIRO, D. D. S.; AMARAL, T. M.; FIGUEIRÓ, M. R.; OLIVEIRA, M. D. S. Transmissão congênita de *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* na epidemiologia da tristeza parasitária bovina. **Embrapa Amazônia Oriental**, Circular Técnica, n. 48, 2019.

BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ASENZO, G.; BENITEZ, D.; BARBA-CARRETERO, J. C.; FORIN-CHRISTENSEN, M. A quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Veterinary parasitology**, v.147, n.1-2, p.16-25, 2007.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v.55, p.611-22, 2009.

CANEVER, M. F.; VIEIRA L. L.; RECK, C.; RICHTER, L.; MILETTI, L. C. First Evaluation of an Outbreak of Bovine Babesiosis and Anaplasmosis in Southern Brazil Using Multiplex PCR. **Korean Journal of Parasitology**, v.52, n.5, p.507–11, 2014.

CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V. et al. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary Microbiology**. v.124, n.1, p.107–14, 2007.

CASA, M. S.; VETTORI, J. M.; SOUZA, K. M.; MILETTI, L. C.; VOGEL, C. I. G.; LIMA, A. L. F. et al. High prevalence of *Anaplasma marginale* in the Crioula Lageana cattle. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.14, n.6, p.623–30, 2020.

- COOKE, R. F.; BOHNERT, D. W.; CAPPELLOZZA, B. I.; MUELLER, C. J.; DELCURTO, T. Effects of temperament and acclimation to handling on reproductive performance of *Bos taurus* beef females. **Journal of Animal Science**, v.90, n.10, p.3547-3555, 2012.
- COSTA, F. B.; MELO, S. A.; ARAÚJO, F. R.; ALBERTO, C.; RAMOS, D. N.; CARVALHO-NETA, A. V. et al. Serological, parasitological and molecular assessment of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from state of Maranhão. **Revista Caatinga**, v.28, n.2, p.8, 2015.
- COSTA, S. C. L.; MAGALHÃES, V. C. S.; DE OLIVEIRA, U. V.; CARVALHO, F. S.; DE ALMEIDA, C. P.; MACHADO, R. Z.; MUNHOZ, A. D. Transplacental transmission of bovine tick-borne pathogens: frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic stability in the northeast of Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v.7, n.2, p.270-275, 2016.
- COSTA, V. M. M.; RIBEIRO, M. F. B.; DUARTE, G. A. F. P.; SOARES, J. F.; AZEVEDO, S. S.; BARROS, A. T. M. et al. Incidência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, p.605–12, 2018.
- ECHAIDE, S. T.; KNOWLES, D. P.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; SUAREZ, C. E.; MCELWAIN, T. F. Detection of Cattle Naturally Infected with *Anaplasma marginale* in a Region of Endemicity by Nested PCR and a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.3, p.777–82, 1998.
- ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J., HARVEY, J. W., BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. Academic press, chapter 5, p.117-155, 2008.
- EXCEL. Microsoft Office and Student, 2019. <<https://www.microsoft.com/pt-br/>>.
- FARIAS, N. A. Tristeza parasitária bovina. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, v.1, cap.7, 524-532, 2007.
- FERREIRA, G. C. M.; CANOZZI, M. E. A.; PERIPOLLI, V.; MOURA, G. P.; SÁNCHEZ, J.; MARTINS, C. E. N. Prevalence of bovine *Babesia* spp., *Anaplasma marginale*, and their co-infections in Latin America: Systematic review-meta-analysis. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.13, n.4, p.101967, 2022.
- GARCIA, K.; WEAKLEY, M.; DO, T.; MIR, S. Current and Future Molecular Diagnostics of Tick-Borne Diseases in Cattle. **Veterinary Sciences**, v.9, n.5, p.241, 2022.
- GARCIA, A. B.; JUSI, M. M. G.; FRESCHI, C. R.; RAMOS, I. A. S.; MENDES, N. S.; DO AMARAL, R. B.; GONÇALVES, L. R.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. High genetic diversity and superinfection by *Anaplasma marginale* strains in naturally infected Angus beef cattle during a clinical anaplasmosis outbreak in southeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.13, n.1, p.101829, 2022.

GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, H. N.; BILHASSI, T. B.; PORTILHO, A. I.; OKINO, C. H.; MARCONDES, C. R. et al. Estimates of repeatability and correlations of hemoparasites infection levels for cattle reared in endemic areas for *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.250, p.78–84, 2018.

GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, H. N.; OKINO, C. H.; SENA OLIVEIRA, M. C. qPCR estimates of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels in beef cattle and *Rhipicephalus microplus* larvae. **Experimental Applied Acarology**, v.75, n.2, p.235–40, 2018.

GIGLIOTI, R.; OKINO, C. H.; AZEVEDO, B. T.; WEDY, B. C. R.; GUTMANIS, G.; VERÍSSIMO, C. J. et al. Semi-quantitative evaluation of *Babesia bovis* and *B. bigemina* infection levels estimated by HRM analysis. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.12, n.5, p.101753, 2021.

GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, H. N.; SANTANA, C. H.; IBELLI, A. M. G.; NÉO, T. A.; BILHASSI, T. B. et al. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, n.5, p.657–62, 2016.

GIGLIOTI, R.; OKINO, C. H.; AZEVEDO, B. T.; WEDY, B. C. R.; GUTMANIS, G.; VERÍSSIMO, C. J.; KATIKI, L. M.; FILHO, A. E. V.; OLIVEIRA, H. N.; OLIVEIRA, M. C. S. Semi-quantitative evaluation of *Babesia bovis* and *B. bigemina* infection levels estimated by HRM analysis. **Ticks and Tick-borne Diseases** v.12, p.101753, 2021.

GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, H. N.; IBELLI, A. M. G.; BILHASSI, T. B.; N´EO, T. A.; SANTANA, C. H.; RABELO, M. D.; MACHADO, R. Z.; CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S. Neither quantification by qPCR nor quantitative Elisa can be used to discriminate Angus cattle for resistance/susceptibility to *Babesia bovis*. **Ticks Tick-borne Diseases**, v.8, n.3, p.335–340, 2017.

GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, v.70, p.270-285, 2008.

GOHIL, S.; HERRMANN, S.; GÜNTHER, S.; COOKE, B. M. Bovine babesiosis in the 21st century: advances in biology and functional genomics. **International Journal for Parasitology**, v.43, n.2, p.125-132, 2013.

GRAU, H. E. G.; CUNHA FILHO, N. A.; PAPPEN, F. G.; FARIAS, N. A. R. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, p.189–93, 2013.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.32, n.2, p.150-156, 2014.

HELLER, L. M.; ZAPA, D. M. B.; COUTO, L. F. M.; AQUINO GONTIJO, L. M. NICARETTA, J. E.; MORAIS, I. M. L. et al. Techniques for monitoring dairy calves against the tick fever agents: a comparative analysis. **Veterinary Research Communications**, v. 46, n.3, p.879–902, 2022.

HENKER, L. C.; LORENZETT, M. P.; FAGUNDES-MOREIRA, R.; DALTO, A. G. C.; SONNE, L.; DRIEMEIER, D.; SOARES, J. F.; PAVARINI, S. P. Bovine abortion, stillbirth and neonatal death associated with *Babesia bovis* and *Anaplasma* sp. infections in southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n.4, p. 101443, 2020.

HORNOK, S.; FÖLDEVÁRI, G.; ELEK, V.; NARANJO, V.; FARKAS, R.; DE LA FUENTE, J. Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.154, n.3–4, p.354–9, 2008.

IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal**, 2021. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>>

KE, G. M.; CHENG, H. L.; KE, L. Y.; JI, W.T.; CHULU, J. L.; LIAO, M. H. et al. Development of a quantitative Light cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. **Journal of Virological Methods**, v.133, p.6–13, 2006.

KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M.. **Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande, MS: EMBRAPA-CNPQC, 1998

KIESER, S. T.; ERIKS, I. S.; PALMER, G. H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. **Infection and Immunity**, v.58, n.4, p.1117–9, 1990.

KIM, C.; ISEKI, H.; HERBAS, M. S.; YOKOYAMA, N.; SUZUKI, H.; XUAN, X. et al. Development of Taqman-Based Real-Time PCR Assays for Diagnostic Detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.77, n.5, p.837–41, 2007.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; STEP, D. L.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F.; SIMPSON, K. M.; GENOVA, S. G.; BOILEAU, M. J. Current challenges of the management and epidemiology of bovine anaplasmosis. **The Bovine Practitioner**, p.93-102, 2010.

KOVALCHUK, S. N.; BABII, A. V.; ARKHIPOVA, A. L. Real-time PCR assay with an endogenous internal amplification control for detection and quantification of *Anaplasma marginale* in bovine blood. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.11, n.2, p.101334, 2020.

LAW, R.A., YOUNG, F.J., PATTERSON, D.C., KILPATRICK, D.J., WYLIE, A.R.G. & MAYNE, C.S. Effect of dietary protein content on animal production and blood metabolites of dairy cows during lactation. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.3, p.1001-1012, 2009.

LOPES, T. V.; SOUZA, J. G. S. G.; ALMEIDA, S. B.; BATISTA, C. C.; ROCHA, M. A.; SCHONS, S. V. et al. Ocorrência de *Babesia* spp. em amostras hematológicas em vacas Nelore e a importância de sua profilaxia na Cidade de Porto Velho – Rondônia. **Research, Society and Development**, v.10, n.10, p.e04101018085, 2021.

LUCENA, R. B.; PIEREZA, F.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; FIGHERA, R. A.; BARROS, C. S. L. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.428-434, 2010.

MACHADO, R. Z.; SILVA, J. B.; ANDRÉ, M. R.; GONÇALVES, L. R.; MATOS, C. A.; OBREGÓN, D. Outbreak of anaplasmosis associated with the presence of different *Anaplasma marginale* strains in dairy cattle in the states of São Paulo and Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v.24, n.4, p.438–46, 2015.

MARTINS, K. R.; GARCIA, M. V.; BONATTE-JUNIOR, P.; DUARTE, P. O.; DE HIGA, L. O. S.; CSORDAS, B. G.; BARROS, J. C.; ANDREOTTI, R. Correlation between *Rhipicephalus microplus* ticks and *Anaplasma marginale* infection in various cattle breeds in Brazil. **Experimental Applied Acarology** v.81, p.585–598, 2020.

MENDES, N. S.; DE SOUZA RAMOS, I. A.; HERRERA, H. M.; CAMPOS, J. B. V.; ALMEIDA ALVES, J. V.; MACEDO, G. C. et al. Genetic diversity of *Babesia bovis* in beef cattle in a large wetland in Brazil. **Parasitology Research**, v.118, n.7, p.2027–40, 2019.

MOHAMMED, A. K.; MOHAMMED, G.; AKEREJOLA, O. O. Haematological and serum biochemical changes in Bunaji work bulls after farmland ridging exercise in Kaduna State, Nigeria. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, p. 576-579, 2007.

MOSQUEDA, J.; OLVERA-RAMIREZ, A.; AGUILAR-TIPACAMU, G.; CANTO, G. Current advances in detection and treatment of babesiosis. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, n.10, p.1504-1518, 2012.

NAGANO, D.; SIVAKUMAR, T.; MACEDO, A. C. C.; INPANKAEW, T.; ALHASSAN, A.; IGARASHI, I. et al. The Genetic Diversity of Merozoite Surface Antigen 1 (MSA-1) among *Babesia bovis* Detected from Cattle Populations in Thailand, Brazil and Ghana. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.75, n.11, p.1463–1470, 2013.

NARLADKAR, B. W. Projected economic losses due to vector and vector-borne parasitic diseases in livestock of India and its significance in implementing the concept of integrated practices for vector management. **Veterinary World**, v.11, n.2, p.151–160, 2018.

OLIVEIRA, G. L. S.; FREITAS, R.M. Diminazene aceturate—an antiparasitic drug of antiquity: advances in pharmacology & therapeutics. **Pharmacological Research**, v.102, p138-157, 2015.

- OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; ARAUJO, J. P.; AMARANTE, A. F. T.; OLIVEIRA, H. N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.130, n.1, p.61–67, 2005.
- OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; REGITANO, L. C. A.; ALENCAR, M. M.; NÉO, T. A.; SILVA, A. M. et al. Detection of *Babesia bigemina* in cattle of different genetic groups and in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick. **Veterinary Parasitology**, v.155, n.3, p.281–286, 2008.
- OLIVEIRA, P. A.; RUAS, J. L.; RIET-CORREA, F.; COELHO, A. C. B.; SANTOS, B. L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Doenças parasitárias em bovinos e ovinos no sul do Brasil: frequência e estimativa de perdas econômicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.8, p.797–801, 2017.
- PAGE, M. J.; MCKENZIE, J. E.; BOSSUYT, P. M.; BOUTRON, I.; HOFFMANN, T. C.; MULROW, C. D. et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **The BMJ**, v. 372, n. 71, 2021.
- PALMER, G. H.; CLOTHIER, K. A. Bovine Anaplasmosis. In: SMITH, B. P. **Large Animal Internal Medicine**, 5<sup>a</sup> ed., Mosby, cap. 37, p. 1054-1056, 2015.
- PAPICH, M. G.; RIVIERE, J. E. Tetracycline Antibiotics. In: RIVIERE, J. E.; PAPICH, M. G. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 10<sup>a</sup> ed., Mosby, cap. 34, p. 858-876, 2018.
- PARODI, P.; CORBELLINI, L. G.; LEOTTI, V. B.; RIVERO, R.; MIRABALLES, C.; RIET-CORREA, F. et al. Validation of a multiplex PCR assay to detect *Babesia* spp. and *Anaplasma marginale* in cattle in Uruguay in the absence of a gold standard test. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.33, n.1, p.73–79, 2021.
- PEREIRA, J. G.; GARCIA, A. B.; GONÇALVES, L. R.; RAMOS, I. A. S.; BRAGA, M. S. C. O.; SANTOS, L. S.; et al. High genetic diversity of *Anaplasma marginale* infecting dairy cattle in northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.30, n. 4, p. e014321, 2021.
- POHL, A. E.; CABEZAS-CRUZ, A.; RIBEIRO, M. F. B.; SILVEIRA, J. A. G.; SILAGHI, C.; PFISTER, K. et al. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.1, p.129–35, 2013.
- QGIS Geographic Information System, QGIS Association. Versão 3.28 Firenze, 2022. <<http://www.qgis.org>>
- RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R.; SOUZA, I. I. F.; BACANELLI, G.; LUIZ, H. L.; RUSSI, L. S. et al. Real-time polymerase chain reaction based on msa2c gene for detection of *Babesia bovis*. **Veterinary Parasitology**, v.176, n.1, p.79–83, 2011.
- RAMOS, I. A. S.; HERRERA, H. M.; DE JESUS FERNANDES, S.; DO AMARAL, R. B.; DE SOUZA ZANATTO, D. C.; DA SILVA, T. M. V.; HORTE, B. L. S.; CAMPOS, J.

- B. V.; ALVES, J. V. A.; MACEDO, G. C.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in beef cattle in the Brazilian Pantanal. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.10, n.4, p.805-814, 2019.
- RECKZIEGEL, G. H.; BAYMA, D. B.; SILVA, T. I. B.; FERNANDES, R. B.; KASSAB, S.; SOUZA, M. D. et al. Outbreak of bovine tick-borne disease on a riverside property in the Western Amazonia: Case report. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.29, n.1, p. 54-58, 2022.
- SÁNCHEZ-CASTRO, M. A.; THOMAS, M. G.; ENNS, R. M.; SPEIDEL, S. E. Genetic prediction for first-service conception rate in Angus heifers using a random regression model. **Translational Animal Science**, v.4, n. 1, p. S43-S47, 2020.
- SANTANA, A. P.; LINHARES, G. F. C.; MURATA, L. S.; BERNAL, F. E.; TORRES, F. A. Dinâmica da infecção natural por *Babesia bigemina* em bezerros a partir do nascimento detectado pela reação em cadeia da polimerase. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p. 721-730, 2008.
- SANTOS, L. R.; GASPAR, E. B.; BENAVIDES, M. V.; TRENTIN, G. Tristeza Parasitária Bovina - Medidas de controle atuais. In: ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. Embrapa Gado de Corte. Capítulo em livro científico (ALICE), 2019.
- SILAGHI, C.; SANTOS, A. S.; GOMES, J.; CHRISTOVA, I.; MATEI, I. A.; WALDER, G. et al. Guidelines for the direct detection of *Anaplasma* spp. in diagnosis and epidemiological studies. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**. v.17, n.1, p.12–22, 2017.
- SILVA, J. B.; CASTRO, G. N. S.; FONSECA, A. H. Longitudinal study of risk factors for anaplasmosis and transplacental transmission in herd cattle. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, n.4, p. 2491-2500, 2014.
- SILVA, J. B.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, n.1, p.20–5, 2016.
- SILVA, J. B.; GONÇALVES, L. R.; VARANI, A. M.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* studied longitudinally under natural transmission conditions in Rio de Janeiro, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.6, n.4, p.499–507, 2015.
- SILVA, J. B.; FONSECA, A. H. Risk factors for anaplasmosis in dairy cows during the paripartum. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 2, p. 461-465, 2014.
- SILVESTRE, B. T.; SILVEIRA, J. A. G.; MENESES, R. M.; FACURY-FILHO, E. J.; CARVALHO, A. U.; RIBEIRO, M. F. B. Identification of a vertically transmitted strain from *Anaplasma marginale* (UFMG3): Molecular and phylogenetic characterization, and evaluation of virulence. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, n.1, p.80–84, 2016.

SMITH, M. F.; POHLER, K. G.; PERRY, G. A.; PATTERSON, D. Physiological factors that affect pregnancy rate to artificial insemination in beef cattle.

**Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle, Staunton, VA.** p. 33-51, 2013.

SOUZA, F. A. L.; BRAGA, J. F. V.; PIRES, L. V.; CARVALHO, C. J. S.; COSTA, É. A.; RIBEIRO, M. F. B. et al. Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in Northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.9, p.1057–61, 2013.

SOUZA, F. A. L.; LIARTE, A. S. C.; CASTRO, K. N. C.; BESERRA, E. E. A.; BERNARDI, J. C. M.; SOUSA, G. V. et al. Dynamics of natural infection by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in dairy cattle from an enzootic instability area in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.27, p.2–6, 2018.

SOUZA, R. S.; RESENDE, M. F. S.; FERREIRA, L. C. A.; FERRAZ, R. S.; ARAÚJO, M. V. V.; BASTOS, C. V. et al. Monitoring bovine tick fever on a dairy farm: An economic proposal for rational use of medications. **Journal of Dairy Science**, v.104, n.5, p.5643–5651, 2021.

TEIXEIRA, V. A.; LANA, A. M. Q.; BRESOLIN, T.; TOMICH, T. R.; SOUZA, G. M.; FURLONG, J. et al. Using rumination and activity data for early detection of anaplasmosis disease in dairy heifer calves. **Journal of Dairy Science**, v.105, n.5, p.4421–4433, 2022.

VIEIRA, L. L.; CANEVER, M. F.; CARDOZO, L. L.; CARDOSO, C. P.; HERKENHOFF, M. E.; NETO, A. T. et al. Prevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and *Babesia bigemina* in cattle in the Campos de Lages region, Santa Catarina state, Brazil, estimated by multiplex-PCR. **Parasite Epidemiology and Control**, v.6, p.e00114, 2019.

VOS, A. J. Distribution, economic importance, and control measures for *Babesia* and *Anaplasma*. In: **Recent Developments in the Control of Anaplasmosis, Babesiosis and Cowdriosis: Proceedings of a Workshop Held at ILRAD, Nairobi, Kenya, 13–15 May 1991.** Ed.: T.T. Dolan. Nairobi: The International Laboratory for Research on Animal Diseases, 1992. ISBN 92-9055-294-7.

WHARTON, R. H.; UTECH, K. B. W. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Casnestrini) (Ixodidae) to the assessment of the tick numbers on cattle. **Australian Journal of Entomology**, v.9, n.3, p.171-182, 1970.

YOKOYAMA, N.; OKAMURA, M.; IGARASHI, I. Erythrocyte invasion by *Babesia* parasites: Current advances in the elucidation of the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors in the invasion stage. **Veterinary Parasitology**, v.138, n.1, p.22–32, 2006.

ZAUGG, J. L. Babesiosis. In: SMITH, B. P. **Large Animal Internal Medicine**, 5th ed., Mosby, cap. 37, p. 1157-1159, 2015.

Zotero. Corporation for Digital Scholarship, EUA. Versão 6.0.10, 2022.  
(<https://www.zotero.org/>)

## **Anexos**

## Anexo A - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal (Inovação)

15/06/2020

SEI/UFPEl - 0968015 - Parecer



**PARECER Nº**  
**PROCESSO Nº**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**46/2020/CEEA/REITORIA**  
**23110.054977/2019-13**

### Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Nova formulação para tratamento de tristeza parasitária bovina**”, registrada com o nº 23110.054977/2019-13, sob a responsabilidade de **Marcio Nunes Correa**- que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **03 de junho de 2020**.

Finalidade	( x ) Pesquisa      ( ) Ensino
Vigência da autorização	01/07/2020 a 01/06/2022
Espécie/linhagem/raça	Bovina/Holandês
Nº de animais	30
Idade	2-6 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Granja 4 irmãos, Rio Grande/RS

Código para cadastro nº **CEEA 54977-2019**

**M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix**

*Presidente da CEEA*

## Anexo B - Documento da Comissão de Ética no Uso de Animais (Artigo 2)



Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da Tristeza Parasitária Bovina sobre a fertilidade de bovinos", protocolada sob o CEUA nº 5550010518 (ID 000047), sob a responsabilidade de **Monique Tomazele Rovani e equipe; Bernardo Garziera Gasperin; Joabel Tonello dos Santos; Alisson Minozzo da Silveira; Lucas Pertile; Leonardo Silva Sacaro; Rogério Ferreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal Farroupilha (CEUA/IFFar) na reunião de 09/05/2018.

We certify that the proposal "Effects of Tick Fever on the fertility of cattle", utilizing 900 Bovines (900 females), protocol number CEUA 5550010518 (ID 000047), under the responsibility of **Monique Tomazele Rovani and team; Bernardo Garziera Gasperin; Joabel Tonello dos Santos; Alisson Minozzo da Silveira; Lucas Pertile; Leonardo Silva Sacaro; Rogério Ferreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Farroupilha Federal Institute (CEUA/IFFar) in the meeting of 05/09/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [09/2018](#) a [09/2020](#)

Área: [Medicina Veterinária](#)

Origem: [Não aplicável](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [2 a 7 anos](#)

N: [900](#)

Linhagem: [Bos taurus taurus](#)

Peso: [350 a 600 kg](#)

Local do experimento: Fazenda Santa Rita

Santa Maria, 30 de agosto de 2019

Dra. Daniela Copetti Santos  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Federal Farroupilha

Dra. Leticia Trevisan Gressler  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Federal Farroupilha