



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO



**DINÂMICA POPULACIONAL DE *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* E NÍVEIS DE INFECÇÃO
ESTIMADA POR qPCR DOS AGENTES DA TRISTEZA
PARASITÁRIA BOVINA EM ANIMAIS DA RAÇA
NELORE E CRUZADOS (ANGUS/NELORE) NO
CERRADO**

Kauê Rodriguez Martins

Campo Grande- MS

2022

Kauê Rodriguez Martins

**DINÂMICA POPULACIONAL DE *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* E NÍVEIS DE INFECÇÃO
ESTIMADA POR qPCR DOS AGENTES DA TRISTEZA
PARASITÁRIA BOVINA EM ANIMAIS DA RAÇA
NELORE E CRUZADOS (ANGUS/NELORE) NO
CERRADO**

*Parasitic intensity of the cattle tick fever agents in Nelore and crossbreed
animals (Angus/Nelore) in Cerrado*

KAUÊ RODRIGUEZ MARTINS

Orientador: Renato Andreotti e Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Campo Grande – MS

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária e Ambiental (FUNDAPAM), Agropecuária Sanyo, a Embrapa Gado de Corte e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Agradeço a toda equipe do laboratório do carrapato que passou ou continua Marcos, Leandro, Pâmella, Leandra, Maria Paula, Paulino, Maria Lorenza, Bárbara, Namor e os demais servidores e colegas que pude conhecer ao longo deste período que continuam dando duro para o desenvolvimento ciência, que nos dias atuais, apesar de toda a contribuição que traz a sociedade, nas mais variadas formas, ainda é pouco valorizada.

Agradeço ao Professor Fábio e Rodrigo pela lembrança e a indicação de trabalhar junto ao Dr. Renato Andreotti e Jacqueline Cavalcante Barros, que me receberam de braços abertos e proporcionaram diversas oportunidades de me aprimorar e que diversas vezes me tiraram da zona de conforto e tenha me moldado em um profissional melhor.

OBRIGADO!

RESUMO

MARTINS, K. R. Dinâmica Populacional de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e níveis de infecção estimada por qPCR dos Agentes da Tristeza Parasitária Bovina em Animais da Raça Nelore e Cruzados (Angus/Nelore) no Cerrado. 2022. Doutorado em Ciências Veterinárias - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2022.

Anaplasma marginale, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* são agentes reconhecidos no Brasil por causar a tristeza parasitária bovina (TPB), doença transmitida pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*. O carrapato e a TPB podem causar prejuízos diretos à saúde animal como anemia hemolítica, aborto, diminuição da produção e mortalidade em bovinos e prejuízos indiretos com insumos, mão de obra para controlar o carrapato e tratamentos para o hospedeiro. De forma geral, esses agentes também podem persistir em rebanhos bovinos sem quaisquer sinais clínicos. Este estudo teve como objetivo correlacionar o número de carrapatos com a quantidade de transcritos pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) visando os genes *msp1α* (*A. marginale*), *cbisg* (*B. Bigemina*) e *cbosg* (*B. bovis*) em bovinos Brangus (Angus x Nelore) e Nelore sem tratamento acaricida no Cerrado brasileiro durante 12 meses. Todos os animais testaram positivo para presença de *A. marginale* e *B. bigemina*, já *B. bovis* não foi detectada por PCR e qPCR. Os animais da raça Brangus apresentaram maior número de carrapatos quando comparados com animais da raça Nelore ($p < 0,05$). Quanto aos resultados do qPCR para *A. marginale*, os animais Brangus apresentaram maior número de cópias que animais Nelore ($p < 0,05$). Para *B. bigemina* os animais Nelore apresentaram maior número de cópias que a raça Brangus ($p < 0,05$). Além disso, ambas as raças não apresentaram diferença estatística significativa no ganho de peso e na sorologia ao longo do ano. Não foi possível estabelecer uma correlação estatística para o número de carrapatos e o número de cópias de *A. marginale* e *B. bigemina*. Os animais não apresentaram qualquer sinal clínico de anaplasmosse ou babesiose, porém, foi detectada a presença de *A. marginale* e *B. bigemina* durante o período experimental, sugerindo que um baixo número de carrapatos pode ser suficiente para manter uma situação enzoótica estável.

Palavras chave: Anaplasmosse, babesiose, diagnóstico molecular, gado de corte.

Abstract

Anaplasma marginale, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* are agents recognized in Brazil for causing cattle tick fever, a disease transmitted by the tick *Rhipicephalus microplus*. Both tick and cattle tick fever, can cause direct damage to animal health such as hemolytic anemia, abortion, decrease in production and mortality and indirect losses with inputs, labor to control the tick and treatments for the host. In general, these agents can also persist in cattle herds without any clinical signs. This study aimed to correlate the number of ticks with the amount of transcripts by the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) targeting *msp1α* (*A. marginale*), *cbisg* (*B. Bigemina*) and *cbosg* (*B. bovis*) genes in Brangus (Angus x Nellore) and Nellore cattle without acaricidal treatment in the Brazilian Cerrado for 12 months. All animals tested positive for the presence of *A. marginale* and *B. bigemina*, while *B. bovis* was not detected by PCR and qPCR. Brangus breed showed a higher number of ticks when compared to animals from the Nellore breed ($p < 0.05$). As for the results of the qPCR for *A. marginale*, Brangus animals had a higher number of copies than Nellore animals ($p < 0.05$). For *B. bigemina* the Nellore animals showed a higher number of copies than the Brangus breed ($p < 0.05$). Furthermore, both races did not show a statistically significant difference in weight gain and serology throughout the year. It was not possible to establish a statistical correlation for the number of ticks and the number of copies of *A. marginale* and *B. bigemina*. Animals showed no clinical signs of anaplasmosis or babesiosis, however, the presence of *A. marginale* and *B. bigemina* was detected throughout the experimental period, suggesting that a low number of ticks can be sufficient to maintain a stable enzootic situation.

Keywords: Anaplasmosis, babesiosis, molecular diagnostic, beef cattle.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
Abstract.....	v
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
4. (I ARTIGO) Correlation between <i>Rhipicephalus microplus</i> ticks and <i>Anaplasma marginale</i> infection in different cattle breeds in Brazil	34
5. (II ARTIGO) Seasonal fluctuation of <i>Babesia bigemina</i> and <i>Rhipicephalus microplus</i> in Brangus and Nellore cattle reared in Cerrado biome, Brazil.....	51
6. CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÃO.....	73
7. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO	73

1. INTRODUÇÃO GERAL

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no ano de 2021, sobre o valor da produção agropecuária, a pecuária de bovinos brasileira movimentou R\$150.942,4 e os estados da região Centro-Oeste lideram com R\$58.258,80 (38,59%) desta produção.

A pecuária de corte, apesar da grande produção, enfrenta graves prejuízos diretos e indiretos sendo um dos principais responsáveis o *Rhipicephalus microplus*, conhecido como “carrapato do boi” e espécies patogênicas dos gêneros *Anaplasma* e *Babesia* por ele transmitidas, responsáveis pela “tristeza parasitária bovina” (TPB). Segundo Grisi et al (2014) estimam-se que os prejuízos causados por este ectoparasita cheguem a 3,24 bilhões de dólares ao ano no país, sendo estas perdas econômicas diretas devido à redução na produção de leite, carne, danos ao couro, infertilidade temporária de machos e fêmeas, além de custo para prevenção e tratamento. Os prejuízos indiretos são resultantes dos custos de mão-de-obra necessária para o seu controle, assim como, das demais despesas com construção e manutenção infraestrutura, compra de equipamentos, aquisição de carrapaticidas, entre outros gastos (GOMES, 2001; AGUIAR, 2016).

Tais prejuízos poderiam ser mitigados utilizando estratégias adequadas para o combate ao carrapato, pois um dos principais métodos utilizados, o tratamento químico, pode não apresentar efetividade adequada (HIGA et al., 2016), devido ao surgimento de resistência às diversas gerações de acaricidas, permitindo o desenvolvimento do carrapato e a transmissão de patógenos ao hospedeiro, que no caso da TPB contribui para o aumento do número de portadores crônicos no rebanho (KOCAN et al., 2003; JACKSON et al., 2014). Estes portadores crônicos, além de possivelmente apresentarem menor produtividade e riscos de óbito, também serão reservatórios de agentes da TPB para futuras gerações de carrapatos do boi. Além destes fatores uma tendência no centro-oeste brasileiro para a criação de raças europeias ou até mesmo cruzamentos entre raças europeias e zebuínas não adaptadas, com o intuito do aumento da produção de carne, porém não tem se mostrado efetiva no quesito resistência à infestação de carrapatos e consequentemente geram perdas

econômicas na cadeia produtiva devido à espoliação e transmissão de patógenos.

Este estudo propõe relacionar o número de carrapatos, com a presença e quantificação dos agentes da TPB ao longo de um ano em populações de animais das raças Brangus e Nelore sem tratamento acaricida no Cerrado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O Carrapato e sua biologia

Os carrapatos são distribuídos mundialmente e sua ecologia está intimamente ligada às condições ambientais (ESTRADA-PEÑA et al., 2012). Estes são ectoparasitas hematófagos obrigatórios e o segundo grupo de vetores, sendo o primeiro os mosquitos, responsáveis pela transmissão de uma grande variedade de toxinas da própria composição de sua saliva, fungos, parasitas, bactérias e vírus patogênicos no processo de alimentação ao seu hospedeiro e de grande importância para medicina humana e veterinária (JONGEJAN & UILENBERG, 2004). Aproximadamente 10% das mais de 956 espécies de carrapatos conhecidas têm importância médica ou veterinária (DE LA FUENTE et al., 2017) e cada espécie de carrapato, dentro destes gêneros, pode ser capaz de transmitir múltiplos patógenos, infectando diversas espécies. Um único carrapato, pode transmitir simultaneamente diversos patógenos a um hospedeiro mamífero, durante o repasto sanguíneo (JACQUOT et al., 2016).

Os carrapatos são atraídos até seu hospedeiro por estímulos como a liberação de dióxido de carbono, temperatura, vibrações, estímulo visual e odor (OSTERKAMP et al., 1999). Além disso, nos locais onde o carrapato alimenta-se, geralmente desenvolvem-se lesões que predisõem seu hospedeiro às infecções secundárias e até mesmo à subsequente oviposição por moscas (gerando miíases) que podem ser atraídas pelas áreas com sangue (RECK et al., 2014).

Os carrapatos são classificados no Filo Arthropoda, Classe Arachnida e subclasse Acari, diferenciando-se dos insetos por não possuírem antenas, mandíbulas e apresentarem uma fusão completa entre cabeça, tórax e abdome., pois seu corpo se divide em duas regiões (tagmas) principais: o gnátossoma

(anterior) e um idiossoma (posterior) (WALL & SHEARER, 2001; ESTRADA-PEÑA et al. 2017). Também são classificados na ordem Ixodida divididos em três famílias: Argasidae (Canestrini, 1890), Ixodidae (Murray, 1844) e Nuttalliellidae (Schulze, 1935). Estes grupos têm como característica geral de desenvolvimento a passagem pelos estádios de ovo embrionado, larva, ninfa e adultos, sendo a fase de larva diferenciada morfologicamente da ninfa e do adulto por apresentar 3 pares de pernas. Os carrapatos podem apresentar ciclo de vida monóxeno, onde realiza sua alimentação, trocas de instares e reprodução sobre um mesmo hospedeiro, descendo somente para a oviposição ou ciclo heteróxico onde pode realizar a alimentação e trocas de instares em diferentes hospedeiros.

A família Argasidae é definida por carrapatos moles, ou seja, dorso desprovido de camadas esclerotizadas, tem o capítulo deslocado para a face ventral, não tem áreas porosas ou glândulas foveais e sua superfície corporal é composta por uma série de discos e mamilões que aparecem tanto nos adultos quanto nas ninfas (WALL & SHEARER, 2001). Os Argasídeos também possuem somente um estágio larval, mas o número de fases da ninfa pode variar entre 3 e 11, fato que é determinado pela frequência da ingestão de sangue, regulando um tamanho crítico que permita sua muda até sua fase de adulto, que poderá ser diferenciado pela presença de poro genital, ausente nos demais estádios (CAMPOS PEREIRA et al., 2008). Os Argasídeos geralmente têm hábito nidícola, vivendo próximo ao hospedeiro em ninhos/tocas, devido a sua alimentação ser mais rápida (geralmente por até 60 min) quando comparada a carrapatos Ixodidae, que são orientados pela fonte de calor mais próxima e tendem a gastar o mínimo de energia possível na espera de seu hospedeiro. Nos carrapatos moles, as ninfas e adultos de ambos os sexos se alimentam rapidamente e se desprendem do hospedeiro, diversas vezes durante sua vida. A alimentação e a oviposição são processos cíclicos e a performance alimentar não está necessariamente relacionada ao acasalamento, pois as fêmeas virgens podem conservar nutrientes no intestino antes de copular (SOJKA et al., 2013).

A família Nuttalliellidae inclui uma única espécie: *Nuttalliella namaqua* (Bedford, 1931), restrita à África do Sul e à Tanzânia. A família Ixodidae é conhecida como carrapatos duros, que têm o dorso parcial ou totalmente coberto por camadas esclerotizadas, característica que permite distinguir fêmeas e

machos adultos de algumas espécies respectivamente. Esta família é composta pelos gêneros: *Ixodes*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Cosmiomma*, *Aponomma*, *Margaropus*, *Rhipicentor* e *Hyalomma*.

Os carrapatos duros se alimentam uma vez por estágio da vida, sendo que as fêmeas ovipõem e morrem. A alimentação destas fêmeas consiste em períodos longos (6-9 dias) seguidos de um rápido ingurgitamento (12-24h) que equivale a dois terços do total de volume de sangue consumido antes de se desprender do hospedeiro (ARAMAN, 1979; SOJKA et al., 2013). Estes longos períodos de alimentação são permitidos mediante a capacidade do carrapato modular a composição de sua saliva durante as diversas fases do processo de alimentação (NARASHIMAN et al., 2007; RIBEIRO & MANS, 2020), composta por uma mistura complexa de peptídeos e não peptídeos capazes de neutralizar a homeostase, imunidade e mecanismos de reparação de tecido de seus hospedeiros (RIBEIRO & MANS, 2020). Entre estes compostos há uma gama de imunomoduladores, anticoagulantes e compostos hemostáticos que permitem o carrapato manter-se no sítio de alimentação despercebido. Além de auxiliar o carrapato a manter-se fixo, a composição salivar distorce o tipo de resposta imune do hospedeiro direcionada ao tipo Th2, o que seria vantajoso para transmissão de patógenos pela saliva (NUTTAL & LABUDA, 2004; KAZIMIROVA & ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013). Além disso o funcionamento do sistema complemento do hospedeiro, que representa grande parte da resposta inata ativada por microrganismos, provocando danos celulares, prejudicam o complexo antígeno-anticorpo e levando a uma inflamação que seria prejudicial à alimentação do carrapato (NARASHIMAN et al., 2020).

O Carrapato do Boi

A espécie *R. microplus* (CANESTRINI, 1888) seria originária da Ásia, introduzida na maioria dos países tropicais e subtropicais por meio da importação de gado deste continente, e sua ocorrência tem sido assinalada em diversos países. (CAMPOS PEREIRA et al., 2008). No Brasil, a introdução deste carrapato provavelmente ocorreu no início do século XVIII por meio de expedições e suas populações permanecem até hoje em todos os estados

independentemente de diferenças climáticas, porém observa-se a presença de diferentes haplótipos nas populações (CSORDAS et al., 2016). Algumas destas populações apresentam maior número de gerações anuais, tal como o cerrado que apresentava de 3 a 4 gerações (GOMES et al., 1989), porém recentemente estudos em ambiente tropical (CRUZ et al., 2020) e de Cerrado (NICARETA et al., 2021) observaram 5 gerações anuais de *R. microplus*, atribuindo tal diferença ao aumento da temperatura ambiental.

O carrapato *R. microplus* é popularmente conhecido como “carrapato do boi” e tem uma ampla distribuição geográfica pelo mundo, especialmente na América Latina. Até o ano 2000 a espécie era denominada *Boophilus microplus*, porém em estudo realizado por Murrell e Barker (2003), houve uma nova classificação do gênero *Rhipicephalus*, renomeando-o para *Rhipicephalus* (*Boophilus*), mantendo-se o gênero *Boophilus* como subgênero, facilitando a recuperação de documentos escritos anteriormente a esse estudo.

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888)

Classificação da espécie de acordo com o Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI-ID: 6941), dos Estados Unidos da América.

- ☐ Reino - Metazoa
- ☐ Filo - Arthropoda
- ☐ Classe – Arachnida
- ☐ Subclasse – Acari
- ☐ Superordem - Parasitiformes
- ☐ Ordem – Ixodida
- ☐ Superfamília – Ixodoidea
- ☐ Família – Ixodidae
- ☐ Subfamília – Rhipicephalinae
- ☐ Gênero – *Rhipicephalus*
- ☐ Subgênero – *Boophilus*

Espécie – *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*

Apesar de *Bos taurus* e *B. indicus* serem os principais hospedeiros de *R. microplus*, outros animais como equinos, ovinos, caprinos, bubalinos e cervídeos também podem ser hospedeiros (BECHARA et al., 2000).

O ciclo de vida do carrapato do boi é caracterizado como monoxeno (de somente um hospedeiro) e estudado em dois momentos, a fase parasitária e a fase não parasitária. A fase parasitária inicia-se com a fixação da larva em regiões do corpo do hospedeiro que favorecem seu desenvolvimento, tais como: úbere, mamas, regiões perineal, perianal, vulvar e entre pernas. Essas regiões preferenciais de fixação são determinadas em função da espessura, vascularização e temperatura da pele, bem como pela dificuldade de autolimpeza do hospedeiro (WANGLAND, 1978).

O carrapato do boi também pode ser considerado reservatório de vírus, bactérias, fungos e protozoários de importância zoonótica (DE LA FUENTE et al., 2017) e a transmissão dos mesmos ao carrapato pode ocorrer de maneira interestadial ou transestadial, que ocorre quando há a infecção em um estágio de desenvolvimento e a transmissão ocorre no estágio seguinte e intraestadial que ocorre quando o macho adulto se infecta em um bovino portador e transmite posteriormente para outro bovino sensível (BURGDORFER & VARNA, 1967; KOCAN et al., 2003). Além disso, no Brasil, *R. microplus* é o principal agente responsável pela tristeza parasitária bovina (TPB), doença causada por riquetsias do gênero *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910), protozoários do gênero *Babesia bovis* (BABES, 1888) e *Babesia bigemina* (SMITH & KILBORNE, 1893). Porém, a transmissão de alguns destes patógenos também pode ocorrer por tabanídeos (HORNOK et al., 2008), culicídeos (EWING, 1981), transmissão transplacentária (COSTA et al., 2016), transfusões de sangue (AGUIRRE et al., 1994; LOBO et al., 2013) e fômites contaminados (SHIELDS et al., 2015).

Resistência do bovino ao carrapato

A resistência e menor atratividade do bovino ao carrapato é influenciada por inúmeros fatores epigenéticos os quais destacam-se: 1) o aumento da histamina nos estágios iniciais da infestação (KEMP & BOURNE, 1980); 2) o tipo e tamanho da pelagem (IBELI et al., 2012); 3) o comportamento de limpeza (DE CASTRO et al., 1985); 4) o tipo de papila na língua (VERÍSSIMO et al., 2015); 5) o aumento do número de eosinófilos, basófilos e mastócitos (MORAES et al., 1992; DE CASTRO & NEWSON, 1993); 6) a presença de padrões específicos de imunoglobulinas (KASHINO et al., 2005) 7) e Células T (PIPER et al., 2010).

Pesquisas datadas da metade do século XIX descrevem o comportamento de limpeza como extremamente importante para a diminuição do número de larvas de *R. microplus* que se prendem ao hospedeiro, e associam este fenômeno à liberação de histamina pelos mastócitos degranulados na área em que a larva se fixa, sendo que a administração de anti-histamínicos em taurinos e zebuínos aumenta a infestação de carrapatos (SNOWBALL, 1956; KOUDSTAAL, 1978).

Andreotti et al. (2018) observaram comportamento semelhante em bovinos da raça Nelore, muitas larvas de carrapato aderidas na pele dos animais, porém estes estágios imaturos não se desenvolveram durante o período dos 18 dias observados, sugerindo que estes instares tentam se desenvolver, porém, os mecanismos de defesa do animal hospedeiro provavelmente inibem seu desenvolvimento. Andreotti et al. (2018) também demonstram que animais de origem europeia apresentam maior infestação de carrapatos, mesmo quando criados junto com animais de origem zebuína.

Tabor et al. (2017) apontam alguns achados em comum a uma série de estudos que procuravam identificar fatores de resistência e susceptibilidade em taurinos e zebuínos como por exemplo a presença de altas densidades de células CD4+, CD25+ e $\gamma\delta$ T, que são observadas consistentemente no gado zebuino, a regulação positiva de IgGs pela maioria das pesquisas no gado suscetível ao carrapato, o complexo de histocompatibilidade II (MHC II) e a proteína de ligação ao cálcio aparentam ter regulação positiva em raças suscetíveis, sendo a última associada a raças suscetíveis estudadas no Brasil.

Outros genes que são consistentemente regulados positivamente em bovinos incluem apolipoproteínas (transporte lipídico), lisoenzimas (antimicrobiano, encontrado em macrófagos e neutrófilos poli nucleares), receptores Toll-like, fator nuclear kappa e seus ativadores C1QTNF7 (complemento C1q do fator de necrose tumoral relacionado com a proteína 7), BCL10 (célula B CCL/ célula de linfoma) e alguns outros fatores complemento (PIPER et al., 2008; FRANZIN et al., 2017). A IL-10 é considerada uma citocina anti-inflamatória apesar de ser induzida precocemente em bovinos suscetíveis, porém, parece estar associada com a resistência de longo termo em bovinos Gir no Brasil (FRANZIN et al., 2017).

A resistência adquirida à infestação de carrapatos já foi relatada por Trager (1939), que notou que, após repetidas infestações de *Dermacentor variabilis* em cobaias, o hospedeiro desenvolve resistência às infestações consecutivas, mostrando um número diminuído de larvas que obtiveram o sucesso em se alimentar.

Também foi observado que o epitélio intestinal do carrapato se modifica morfológicamente durante o processo de alimentação, especialmente durante a re-infestação, devido a uma resposta imunológica do hospedeiro que libera anticorpos contra o parasita, que adquire resistência aos produtos secretados pelo tubo digestivo e glândula salivar do carrapato (KEMP et al., 1986; CAPERUCCI et al., 2009). Alguns relatos indicam que cerca de 60% das fêmeas de *R. microplus* não conseguem completar o processo de ingurgitamento devido a mudanças no intestino e não conseguem ovipor, provavelmente em função da resposta imune do hospedeiro (KEMP et al., 1986; CAPERUCCI et al., 2009). Estas mudanças no epitélio intestinal foram analisadas com infestações sequenciais em um mesmo hospedeiro, revelando o desenvolvimento de resistência ao carrapato (SHAPIRO et al., 1987; CAPERUCCI et al., 2009).

A imunidade adquirida à infestação de carrapatos se estabelece após um período de suscetibilidade à infestação primária (WAGLAND, 1978). Os perfis da expressão gênica em raças resistentes ao carrapato parecem coincidir com a resposta mediada por células-T, enquanto os bovinos suscetíveis exibem uma resposta inata e inflamatória com altos níveis de IgG1 específicos do carrapato (TABOR et al., 2017).

Um fato consistente é que o bovino resistente, mesmo não exposto ao carrapato, parece estar preparado para uma resposta contra a primeira infestação com presença mais abundante de células $\gamma\delta$ T na pele, em comparação com bovinos suscetíveis (TABOR et al., 2017).

Piper et al. (2009) demonstraram que *Bos indicus* desenvolvem uma resposta mediada por células T à infestação por carrapatos, evidenciando seu perfil celular e leucocitário. Já *B. taurus* apresenta uma expressão celular e gênica consistente com uma resposta inata, resposta inflamatória à infestação, além de altas titulações de IgG1 específicas ao carrapato, sugerindo que estes animais também desenvolvem uma resposta por células-T à infestação.

O número de mastócitos na pele varia de acordo com a raça segundo Moraes et al. (1992), que analisaram biópsias da área da virilha observando para a raça Gir mais que o dobro do número de mastócitos dérmicos em relação ao gado Holandês. Enquanto que Lavielle et al. (1985) identificaram o dobro número de mastócitos dérmicos na região costal na raça Indubrasil quando comparados com cruzados F1 (Holandês x Indubrasil).

Engracia et al. (2006) demonstraram que animais cruzados de segunda geração (F2) adquiriram resistência contra *R. microplus*, provavelmente associado ao número de mastócitos dérmicos, concluindo que a infestação leva a uma modificação ambiental na área parasitada pela migração massiva de mastócitos para a área.

A raça zebuína tem se provado resistente às infecções causadas por *A. marginali*, *B. bovis* e *B. bigemina*, quando comparada com raças de origem europeia (BOCK et al., 1997; 1999).

Anaplasmosse

Segundo Raoult (1997) as riquetsias patogênicas multiplicam-se em quase todos os fluidos e órgãos do carrapato, particularmente na glândula salivar, permitindo a transmissão de organismos durante a alimentação e nos ovários, permitindo a infecção da prole. Algumas outras bactérias são capazes de infectar os ovários de carrapatos, porém não infectam as glândulas salivares que por sua vez não serão transmitidas a hospedeiros vertebrados, onde poderiam causar alguma doença (BELL et al., 1963)

A anaplasmosse é causada por bactérias Gram-negativas da família *Anaplasmataceae* na ordem das *Rickettsiales* que infectam persistentemente (RISTIC & WATRACH, 1963) ruminantes causando morbidade, mortalidade e diversas perdas econômicas (KOCAN et al., 2000). A infecção por *Anaplasma marginale* (THEILER, 1910) é restrita a ruminantes, porém algumas outras espécies como *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma platys* e *Anaplasma ovis* podem causar doenças em ovinos, bovinos, equinos, canídeos e, até mesmo, em humanos.

De todos os exemplos, dois patógenos em especial, *A. marginale* e *A. phagocytophilum*, têm maior atenção devido a sua patogenicidade e persistência

no organismo do hospedeiro, pois invadem e replicam-se em células sanguíneas distintas (eritrócitos e neutrófilos respectivamente). Ambas desenvolveram mecanismos de variação antigênica similares que resultam na evasão imune e consequentemente na infecção persistente (DE LA FUENTE, et al., 2002; BROWN & BARBET, 2016). Estas bactérias desenvolvem funções distintas para causar disfunção imune, caracterizada pela exaustão antígeno específica CD4 em células T para *A. marginale* e uma imunossupressão para *A. phagocytophilum* (WOLDEHIWET, 2008).

Anaplasma marginale não provoca a ruptura da hemácia em sua saída e, embora seja encontrada em vários tecidos do vetor, a transmissão vertical no carrapato é controversa. Além disso, *A. marginale* tem a capacidade de ser transmitida mecanicamente por insetos hematófagos (moscas, mosquitos, tabanídeos), por fômites contaminados (agulhas, aparelhos cirúrgicos), de forma transplacentária (COSTA et al., 2016) em alguns mamíferos ou transfusões com sangue infectado (AUBRY & GEALE, 2011; SHIELDS et al., 2015).

Em cada fase de desenvolvimento, os carrapatos Ixodidae monóxenos se alimentam somente uma vez e a bactéria, adquirida pelo carrapato do hospedeiro durante a alimentação, só será transmitida após a muda da sua próxima fase de desenvolvimento (RAOULT, 1997). No hospedeiro invertebrado, o ciclo biológico inicia com o repasto sanguíneo, uma vez que o sangue contém os eritrócitos infectados. As rickettsias ao chegarem no intestino do carrapato, infectam as células intestinais onde se desenvolvem e migram para outros tecidos do carrapato, incluindo as glândulas salivares, via esta utilizada para a transmissão da *A. marginale* para outros hospedeiros vertebrados (KOCAN et al., 2010), porém, nem todo isolado de *Anaplasma* parece ser capaz de infetar o carrapato (RUIZ et al., 2005).

As hemácias podem ficar aderidas às peças bucais dos carrapatos e insetos ou instrumentos cirúrgicos, logo sendo inoculadas em outro animal, causando problemas devido à grande capacidade de multiplicação de *Anaplasma* (EWING, 1981). No hospedeiro vertebrado, o ciclo biológico da *A. marginale* se inicia a partir da inoculação do patógeno no bovino pelo vetor invertebrado, que passa então a infectar as células sanguíneas em poucos dias, sendo que a multiplicação da rickettsia se dá por fissão binária no citoplasma

das células infectadas formando um vacúolo que pode conter de quatro a oito corpúsculos (KOCAN et al., 2003; 2010).

Na fase inicial da infecção, ocorre o aumento exponencial dos eritrócitos infectados, mas esse aumento depende da suscetibilidade do hospedeiro, da dose infectante e da patogenicidade da cepa de anaplasma (KOCAN et al., 2010; AUBRY & GEALE, 2011). Quando a infecção é detectada pelo sistema imune do hospedeiro vertebrado, os eritrócitos infectados são fagocitados por células do sistema retículo endotelial do animal, o que leva à ocorrência da sintomatologia clínica, tais como anemia e icterícia sem ocorrência de hemoglobinúria. Os animais que sobrevivem à infecção tornam-se permanentemente infectados, atuando como reservatórios (KOCAN et al., 2003). O período de incubação da infecção pode variar de 7 a 60 dias, dependendo da quantidade de vetores se alimentando e da quantidade de bactérias inoculadas (KOCAN et al., 2003).

Tais animais apresentam baixa parasitemia e contribuem para a manutenção da endemicidade da doença nos rebanhos (KOCAN et al., 2010), associado ao uso indiscriminado da terapia farmacológica utilizando tetraciclina, antibióticos de amplo espectro no tratamento e prevenção contra uma gama de bactérias gram-negativas, gram-positivas, clamídia, micoplasma, rickettsia e alguns protozoários (MICHALOVA et al., 2004), pode levar ao desenvolvimento de resistência a fármacos pelas anaplasmas devido a mutações (COETZE et al., 2006).

Estudos recentes tentando eliminar o parasita de um hospedeiro crônico não têm obtido uma taxa satisfatória na eliminação total do organismo, chegando a um máximo de 50% utilizando fármacos de longa ação (SARLI et al., 2021). Além disso, a ausência de uma vacina efetiva torna o desenvolvimento de antibióticos efetivos essencial para o controle da anaplasmosse, possibilitando a remoção da infecção persistente dos rebanhos (SHAHABAZI et al., 2020).

Na maioria dos casos a doença tem caráter clínico subagudo principalmente nos animais jovens, devido a intensa atividade do baço (GOFF et al., 2001). A temperatura retal aumenta aos poucos e, ocasionalmente, excede 40,5 °C mantendo-se elevada ou flutuando em períodos irregulares de febre e temperatura normal, mudando durante alguns dias ou durante até duas semanas e a anorexia dificilmente é intensa.

O animal pode vir a óbito nesse período, porém muitos sobrevivem em estado de caquexia e com prejuízo da fertilidade. As mucosas encontram-se ictéricas e pálidas, pois os parasitas infectam a série vermelha do sangue (eritrócitos), especialmente após a fase aguda, não ocorrendo hemoglobinúria (RADOSTITS, 2002). A ausência de hemoglobinúria auxilia na identificação da anaplasmoze, diferenciando de outras doenças hemolíticas como babesiose, theileriose, hemoglobinúria bacilar, leptospirose e intoxicações (SMITH, 2006).

Estudos recentes utilizando técnicas moleculares identificaram diferenças filogenéticas entre isolados de *A. marginale* obtidos de diferentes regiões geográficas (DE LA FUENTE, 2002), também demonstrando estas diferenças podem se traduzir em mudanças na ecologia da doença como a pressão de seleção, manejo, tratamento e até mesmo constituição genética do hospedeiro e de seus vetores artrópodes (SHAHABAZI et al., 2020; DALL'AGNOL et al., 2021). Um exemplo é o isolado da Flórida que não era capaz de ser transmitido pelo carrapato, enquanto que o isolado de Oklahoma era transmissível (DE LA FUENTE et al., 2002). Tal diferença foi associada com mudanças no gene MSP1a, sendo que essas observações poderiam ser extrapoladas para outras diferenças filogenéticas que se traduziriam em susceptibilidade antimicrobiana. Além disto, é possível detectar-se infecções complexas, onde observa-se mais de uma estirpe de *A. marginale* em um mesmo animal (KOKU et al., 2021), que pode facilitar a sua persistência no hospedeiro (BROWN & BARBET, 2016).

A evasão imune se dá principalmente por uma das 6 proteínas majoritárias de superfície (MSP's) conhecidas, como a MSP5, MSP4 e MSP1 amplamente estudadas em diversas regiões do mundo (DE LA FUENTE et al., 2003a; DE LA FUENTE et al., 2003b; CABEZAS-CRUZ et al., 2013; MACHADO et al., 2015; RAMOS et al., 2019). MSP1 é composta por dois peptídeos ligados não covalentemente, MSP1a e MSP1b (BARBET et al., 1987).

A MSP1a é uma proteína de 70-100 kDa (OBERLE et al., 1988) codificada por um gene de cópia única e contém um variado número de nucleotídeos de repetição em tandem e cópia única conservada durante a multiplicação no bovino e no carrapato (BOWIE et al., 2002). Tal gene traduz uma adesina envolvida na adesão de eritrócitos bovinos e células do carrapato e são amplamente utilizados em estudos (KOCAN et al., 2003). Logo, sequências de MSP1a têm sido utilizadas para classificação de estirpes em determinadas populações devido a

sua alta variabilidade e a MSP4 tem sido utilizadas como fator para definir padrões filogeográficos, por ser mais conservada (DELA FUENTE et al., 2004, VIDOTTO et al., 2006)

Durante a fase aguda da doença, o diagnóstico é realizado pela observação de *A. marginale* por esfregaço sanguíneo (RIBEIRO & REIS, 1981), porém, durante a fase crônica, este método não tem a sensibilidade necessária para detectar animais que portam níveis baixos de parasitemia (PALMER et al., 1986, ECHAIDE et al., 1998). A detecção pode ser realizada também pelo ensaio de imunoadsorção enzimática-ELISAs (RAMOS et al., 2010). No entanto, devido ao grande número de antígenos disponíveis atualmente, torna-se necessária uma avaliação para definir quais antígenos apresentam um melhor desempenho no diagnóstico da anaplasmoze. Conforme Garcia (2020), a soropositividade indicada pelo ELISA utilizando antígeno total e a proteína de superfície MSP5 para *A. marginale* é baixa, apesar dos animais serem positivos nos ensaios de qPCR, mostrando assim uma possível evasão apresentada pelo patógeno ou imunossupressão causada pela presença e atividade constante do patógeno.

Além disso, pode-se utilizar o método molecular que possibilita detectar a presença de DNA do patógeno em amostras de DNA genômico extraídas a partir do sangue de um animal e, dependendo dos primers utilizados, diferenciar a presença de algumas espécies anaplasma pelo método de PCR (ECHAIDE et al, 1998) ou, até mesmo, detectar e quantificar o DNA do patógeno na amostra pelo método do qPCR (RAMOS et al., 2010).

Babesiose

A investigação de Smith e Killborn (1883) realizada no sul dos Estados Unidos, resultou na descoberta de uma misteriosa doença que espalhava-se de bovino para bovino por carrapatos servindo como vetor de transmissão. Esta doença, mais tarde, ficou conhecida como babesiose, que é causada por protozoários da ordem Piroplasmida, do filo Apicomplexa, contendo as Babesias e Theilerias, parasitas transmitidos por carrapatos de alta importância em animais domésticos e silvestres (ADL et al., 2012).

As quatro espécies principais, *Babesia bovis* (BABÉS, 1888), *Babesia bigemina* (SMITH & KILBORN, 1893), *Babesia divergens* (M'FADYEAN &

STOCKMAN 1911) e *Babesia major*, podem infectar os bovinos, sendo transmitidas por um carrapato da família Ixodidae, porém no Brasil, as de maior predominância e importância são *B. bigemina* e *B. bovis*. Apesar disso, existe a identificação de espécies de *Babesia* infectando roedores, canídeos, primatas, equinos, cervídeos (SCHNITTGER et al, 2012; SPRINGER et al., 2005; ONYICHE et al., 2021). *Babesia bigemina* e *B. bovis* não parasitam outras células de hospedeiros vertebrados além dos eritrócitos e a eficiência da transmissão é atribuída pela saliva do carrapato, que provavelmente facilita a infecção com sua atividade farmacológica antiinflamatória/ imunossupressora (KRAUSE et al., 2009).

Segundo o Center for Food Security and Public Health (SPIKLER, 2018), *B. bovis* desenvolve-se em cerca de 2-3 semanas após o carrapato anexar-se ao hospedeiro. Na fase larval do carrapato existe um período de 2-3 dias para *B. bovis* de 9 dias para *B. bigemina* se tornarem infectantes. Após a infecção há um período de incubação de 10-12 dias para *B. bovis*, enquanto que, para *B. bigemina*, um período de incubação de 4-5 dias. Os sinais clínicos normalmente aparecem cerca de 2-3 semanas após a picada.

Os sinais clínicos apresentados pelos animais acometidos pela babesiose iniciam-se com um quadro de intensa apatia e prostração; as mucosas oculares apresentam-se intensamente pálidas ou amareladas, indicando anemia ou icterícia, taquicardia, taquipnéia, edema, febre alta (acima de 40°C), pelos arrepiados e ásperos; urina com cor de chocolate (hemoglobinúria) (WRIGHT et al., 1989).

Nos casos de babesiose causada por *B. bovis*, os animais poderão apresentar sinais neurológicos, especialmente relacionados à locomoção, como andar cambaleante, incoordenação, principalmente dos membros posteriores, tremores musculares, agressividade e quedas com movimentos de pedalagem, evoluindo para óbito dentro de alguns dias. Tal morbidade ocorre devido a eritrócitos infectados por *B. bovis*, diferente de *B. bigemina*, terem a capacidade de aderir a células vasculares endoteliais e acumular em microvasos para evitar a destruição no baço (WRIGHT et al. 1989; ECHAIDE et al., 1998), fato que reduz a microcirculação e leva o local à anoxia tecidual prejudicando órgãos como os rins, pulmões e cérebro (BROWN et al., 2006; SANTOS, 2013). Apesar de *B. bigemina* ser considerada menos patogênica, é capaz de exceder de 10 a

30% de eritrócitos parasitados, enquanto *B. bovis*, geralmente, não ultrapassa 1% (UILENBERG, 2006).

Animais jovens são susceptíveis à infecção, porém seus sinais clínicos são brandos quando comparados a um animal mais velho infectado pela primeira vez e animais com mais de três anos de idade sem exposição prévia à doença tem maior chance de desenvolver um grau superagudo e fatal da doença (RADOSTITS, 2002).

Quando um carrapato infectado se alimenta de um hospedeiro vertebrado, esporozoítos presentes na glândula salivar migram para a corrente sanguínea do hospedeiro em busca de eritrócitos (GOHIL et al., 2013). O esporozoíto penetra na membrana celular com o auxílio do complexo apical característico pelo processo de invaginação, formando um vacúolo parasitóforo (KAKOMA & MELHLHORN, 1993), uma vez no interior da célula transforma-se em trofozoíto e desenvolve-se em dois merozoítos pelo processo de fissão binária (FRIEDOFF et al., 1988; ANTUNES et al., 2017). Esta multiplicação é assíncrona e observam-se vários estádios de desenvolvimento na corrente sanguínea ao mesmo tempo.

Após este desenvolvimento há o rompimento do eritrócito e cada merozoíto invade novas células. Alguns merozoítos dão origem a pré-gametócitos (KARAKASHIAN et al., 1983) que, uma vez ingeridos pelo carrapato, se desenvolvem em gametócitos e, após algumas horas se desenvolvem em corpos radiados. Estes gametas se fundem ao lúmen do intestino do carrapato originando uma célula (Zigoto) capaz de invadir as células intestinais do carrapato, desenvolvendo a capacidade de mobilidade denominada oocineto (MEHLHORN & PETERS, 1980; RUDZINSKA et al. 1979).

Posteriormente há uma divisão meiótica e a fuga das células do epitélio intestinal, invadindo os demais tecidos do carrapato, inclusive nos ovários, resultando em ovos infectados. Uma subsequente multiplicação assexuada ocorre, continuando o estágio de esporogônio subsequente diferenciação em esporocineto, e poderão alcançar a glândula salivar do carrapato, desenvolvendo o estágio final no carrapato conhecido como esporozoítos, sendo capaz de infectar o hospedeiro vertebrado na próxima alimentação do carrapato (HOMER et al., 2000). Ao se alimentar novamente, o carrapato infecta-se ao ingerir hemácias parasitadas, sendo que a infecção da teleógina pode ocorrer

nas últimas 16-24h após a ingestão das hemácias parasitadas, que então são digeridas, liberando merozoítos na luz intestinal da teleógina (CALLOW, 1968).

Babesia bovis é inoculada apenas por larvas do carrapato, sendo que o início do repasto sanguíneo na larva e a temperatura corporal do bovino estimulam a multiplicação dos estágios imaturos no carrapato. Babesias multiplicam-se a partir de um esporozoíto e posteriormente rompem as células das glândulas salivares da larva, atingem o canal salivar e são inoculadas no hospedeiro (MAHONEY & MIRRE, 1974).

O carrapato adulto é o principal vetor da *B. bigemina* para o bovino, sendo que as fêmeas do carrapato apresentam risco de transmissão transovariana e um período de alimentação prolongado (FRIEDHOFF et al., 1988). Cada fêmea de *R. microplus* tem a capacidade de ovipor cerca de 2.000 ovos e foi proposto por Mahoney e Mirre (1977) que os carrapatos teriam desenvolvido uma estratégia de ovipor antes que os cinetos invadam o ovário e os embriões em desenvolvimento, os primeiros ovos seriam colocados 72h após a alimentação e a primeira infecção de ovos apareceria após 92h após alimentação e colocando alguns ovos antes de serem infectados pelo parasita a fêmea garantiria que a progênie esteja livre de babesias.

É estabelecido que larvas de *R. microplus* não têm a capacidade de transmitir *B. bigemina* para seu hospedeiro, porém esta é capaz de ser inoculada nos bovinos de 8-10 dias após o início da alimentação pelas ninfas e adultos infectados devido presença de esporozoítos (CALLOW E HOYTE, 1961; RIEK, 1964), enquanto que *B. bovis* é capaz de ser transmitida por larvas de 2-3 dias após o início da alimentação (CFSPH, 2008).

Larvas de *R. microplus* infectadas permitem afirmar que o período entre o quinto e o 17º dia de incubação é o indicado para obtenção das amostras de hemolinfa e o diagnóstico de *B. bovis* no carrapato vetor (BARREIRA et al., 2005).

Imunidade inversa

Bezerros apresentam alta resistência à infecção por babesias (TRUMAN & BLIGHT 1978). Alguns autores afirmam que eles adquirem passivamente imunidade do colostro por aproximadamente 2 semanas (MADRUGA et

al.,1984), seguido de uma imunidade inata contra babesiose dos 3 aos 9 meses de idade (GOFF et al., 2001).

Bezerros jovens também apresentam uma forte resposta inata dependente do baço contra infecções iniciais de *B. bovis* envolvendo citocinas reguladoras de tipo 1 como Interleucina-12 e interferon gama (IFN- γ), que ativam monócitos em resposta à atividade microbiana (GOFF et al., 2003; 2006).

Alguns autores também atribuem esta resistência à idade, grande parte parece relacionada à resposta imune inata devido à alta atividade eritropoiética da medula, a diferenças nas respostas associadas a citocinas T-Helper 1 (Th1) e a liberação de óxido nítrico (NO) (BROWN et al., 2006). Porém, Brake et al. (2012) analisaram a resposta de macrófagos frente a extratos de glândulas salivares do carrapato e identificaram uma regulação negativa e dose dependente de citocinas pró-inflamatórias e promotoras de Th1 e IL-12.

Em áreas onde há circulação de carrapatos e circulação de doenças transmitidas eles, ainda há a necessidade de controlar a exposição de animais jovens para manter a estabilidade enzoótica. A resistência de populações de carrapatos pode manter o balanço, particularmente quando os produtores continuam a usar o mesmo acaricida após a resistência ter sido identificada (FOIL et al., 2004). Deve-se tomar cuidado pois o uso destes pesticidas para o controle de outras pestes além do carrapato pode interferir na resistência e na dispersão de doenças associadas ao carrapato (FOIL et al., 2004).

Estudos utilizando extrato de glândula salivar e saliva de carrapatos *Dermacentor andersoni*, *Ixodes pacificus*, *I. ricinus*, e *R. sanguineus* (HAJNICKA et al., 2005) demonstram a capacidade de substâncias com atividade anti-citocinas de eliminar ou prevenir respostas do tipo Th1 (MEJRI et al., 2001) tal como o fator de necrose tumoral (TNF α), interferon gama (IFN γ) e interleucina 1b(IL-1b), promovendo uma regulação positiva da interleucina-10 (IL-10) e Interleucina-4 (IL-4), consideradas como resposta típica de polarização Th2 (BROWN et al., 1998).

A saliva do carrapato modula a resposta imune do hospedeiro para um fenótipo Th2 (NUTTALL & LABUDA, 2004), que normalmente é associada a moléculas como IL-4, 5 e 13 associadas à produção de IgE e respostas eosinofílicas podem beneficiar a transmissão dos patógenos transmitidos por *R. microplus* como as babesias que seriam controladas facilmente por uma

resposta do tipo Th1, que é associada a respostas pró-inflamatórias responsáveis por eliminar parasitas intracelulares e perpetuar resposta imune (BROWN et al., 1998; KAZIMIROVA & ŠTIBRÁNIOVÁ, 2013).

Transmissão ovariana de babesias ao carrapato e estabilidade enzoótica

De acordo com Mahoney e Mirre (1971) há uma baixa porcentagem de transmissão transovariana de *Babesia*, mesmo se infectam o animal durante a fase aguda da doença. As taxas de transmissão são de 20 a 40% para *B. bigemina* e 0.5 a 14.5% para *B. bovis*, quando observado por microscopia.

Guerrero et al. (2007) relatam que fêmeas de *R. microplus* ingurgitadas em animais infectados produziram uma progênie com taxas de 12 a 48% de larvas infectadas. Porém, larvas provenientes de fêmeas repletas com baixos níveis de infecção por cinetos demonstrados por microscopia e PCR apresentaram infecção de 22 a 30% com capacidade de transmitir *B. bovis* durante a alimentação. Já para *B. bigemina*, Howell et al. (2007) também observam 12 a 48% na progênie. Hussein et al. (2019) silenciaram a expressão do receptor de vitelogenina no ovário mediante RNA de interferência (iRNA), observaram a produção reduzida de ovos, menores taxas de desenvolvimento embriológico e menor eclodibilidade, além de interferir na transmissão transovariana de *B. bovis*, onde 0% das larvas injetadas com o iRNA estavam infectadas e 12 e 17% dos grupos não injetados apresentavam infecção por *B. bovis*.

Estudos utilizando a sorologia no Brasil apresentaram resultados altamente variáveis dependendo da região e do teste utilizado. No Mato Grosso do Sul observa-se uma prevalência sorológica de 23% para *B. bigemina* (KESSLER et al., 1987). Alta incidência de *B. bigemina* é observada em municípios da região do Pantanal 87.7-98.9% em gado predominantemente Nelore (MADRUGA et al., 2001).

Brito et al. (2013) e Silva et al. (2014) observaram alta incidência na região amazônica para *B. bovis* (Rondônia 95.1, Acre 96.1% e Pará para *B. bigemina* e *B. bovis* 97%) e atribuem estes altos índices as ótimas condições para a reprodução de *R. microplus*. Vieira et al. (2019) observam 16 e 29% para *B. bigemina* e *B. bovis* respectivamente no estado do Paraná que atribuem a

soroprevalência estar associada com o manejo individual das propriedades rurais e as variações climáticas que interferem diretamente com o desenvolvimento dos vetores.

Porém existem relatos de reação cruzada em testes de ELISA entre *B. bigemina* e *B. bovis* utilizando o extrato total ou, até mesmo, diversos antígenos recombinantes, devido ao polimorfismo antigênico apresentado por algumas espécies de *Babesia* (FUJINAGA et al., 1980; MCELWAIN et al., 1988; MACHADO et al., 1997; BOONCHIT et al., 2004), como por exemplo, a observação de antígenos comuns entre *B. divergens* europeia e *B. bigemina* e *B. bovis* mexicana por Figueroa et al. (2006).

Segundo Mahoney e Ross (1972), a estabilidade enzoótica é estabelecida quando os limiares de soroprevalência entre 12 e 75% seriam suficientes para proteger os bezerros de surtos de babesiose antes que a resistência inata para a doença clínica desapareça entre 6 e 9 meses de idade, isto asseguraria que a maior parte dos animais estaria infectada e imune antes de alcançar uma idade onde seriam susceptíveis a doença

Entretanto, Jonsson et al. (2012) criticam este conceito de estabilidade enzoótica e não recomendam a aplicação dele para modelos de estudo hospedeiro-carrapato-patógeno com carrapatos que não sejam *R. microplus*, raças zebuínas e não estude doenças que não apresentam imunidade inversa (*A. marginale*, *B. bigemina*, *B. bovis*). Estes autores ainda propõem que para esta interação carrapato-hospedeiro-patógeno seriam necessários dados relacionando as taxas de infecção dos próprios carrapatos (GIGLIOTI et al., 2018), a infestação do gado com carrapato (GIGLIOTI et al., 2016; 2018), a soro prevalência periódica e a incidência da doença nos diversos genótipos animais.

Outro fator que pode prejudicar a aplicação é a limitação na inabilidade de garantir exposição suficiente aos bezerros/gado pelo período (devido ao manejo, clima e outras variáveis ambientais) é dependente do conhecimento da proporção do rebanho que está imune, tal proporção seria difícil de determinar devido ao declínio da sensibilidade de testes sorológicos após a exposição, necessitando acompanhamento anual, tornando o processo inviável economicamente (JONSSON et al., 2012).

Mecanismo de variação antigênica

Além da capacidade de transmissão transovariana, *B. bigemina* e *B. bovis* são alguns dos hemoparasitas capazes de estabelecer infecções crônicas de longa duração. Mesmo que seu hospedeiro bovino consiga estabelecer uma resposta imune que controle a infecção, o parasita continua a proliferar na corrente sanguínea em níveis de parasitemia que estão abaixo da detecção por microscopia (O'CONNOR et al., 2000). Tal evento ocorre pela modificação morfológica na forma de pequenas cristas na superfície de eritrócitos infectados e diferentes modificações antigênicas ao longo da infecção como observado por Curnow (1973).

Possivelmente esta capacidade de entrar em equilíbrio seja explicada pela capacidade de variar os antígenos contra a imunidade do hospedeiro, via modificações sequenciais dos antígenos de superfície derivados (Variant erythrocyte surface antigen - VESA) do parasita expressados na superfície de células vermelhas infectadas (JACKSON et al., 2014), tornando seu hospedeiro um portador permanente.

Controle da TPB utilizando fármacos

Dipropionato de Imidocarb e o aceturato de diminazeno são as únicas drogas anti-babesia autorizadas no mercado internacional que fornecem proteção de sinais clínicos por 3-6 semanas e oferecem uma imunidade estéril no tratamento de bovinos (ZINTL, et al., 2003). O dipropionato de imidocarb é uma diamidina aromática com vários mecanismos de ação (MCHARDY et al., 1983; 1986) que interfere na produção de poliaminas por parasitas, como por exemplo *Trypanosoma brucei* (BACCHI et al., 1981). O Imidocarb é excretado via fígado e rim, sendo eliminado na urina e nas fezes, gerando um período de carência de 30-241 dias dependendo do produto e dose utilizada.

Um nível suficiente de parasitemia pode ser desenvolvido em animais tratados com imidocarb para permitir o desenvolvimento da doença subclínica (RIZK, et al., 2019). Além disso, alguns animais com babesiose aguda não responderam ao tratamento com imidocarb e a resistência pode ser desenvolvida (MOSQUEDA et al., 2012).

Para o tratamento da anaplasmosose geralmente são utilizadas as Tetraciclinas, antibióticos bacteriostáticos que inibem a síntese de proteína se ligando a subunidade ribossomal 30S de organismos susceptíveis (PLUMB,

2002). A Oxitetraciclina, um derivado da Tetraciclina é uma das mais utilizadas, porém a dose recomendada (STEWART et al., 1979) e nem repetidas aplicações intramusculares de Oxitetraciclina de longa duração são eficazes em eliminar a anaplasmoze de portadores crônicos (COETZE et al., 2005). Parasitemias persistentes por um longo período de tempo podem ser consideradas uma desvantagem, pois os parasitas podem tornar a se desenvolver sob condições favoráveis, fazendo do indivíduo um reservatório da doença, e parasitas sobreviventes ao tratamento podem adquirir resistência (ZINTL et al., 2003).

Diagnóstico molecular

Técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas com o intuito de detectar certas moléculas, desde aminoácidos a proteínas e complexas interações entre células e organismos. Na medicina veterinária tais técnicas são corriqueiramente utilizadas para o diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias, produção de proteínas e vacinas terapêuticas, terapias gênicas, genotipagem, detecção de resistência em patógenos e perfil genético de indivíduos e a sua associação com doenças.

Quanto a aplicação das técnicas da biologia molecular, a reação em cadeia da polimerase (PCR) desenvolvido por Kary B. Mullis na década de 80 culminando na publicação de 1986 “Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction” é uma das mais difundidas. A partir dessa técnica que consiste na amplificação de uma sequência específica de DNA pelo uso de enzimas, diversas variações foram desenvolvidas, dentre elas a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) desenvolvida por Higuchi et al. (1992,1993) que poderia monitorar a PCR pela adição de marcações fluorescentes que se ligavam ao produto de PCR acumulado, logo aumentando o sinal da fluorescência concomitantemente ao número de produtos de PCR.

Isto conferiu à técnica a capacidade de detectar e quantificar pequenas quantidades de material genético sendo amplificado em uma gama de amostras e fontes. Esta ideia foi aprimorada e atualmente há duas maneiras dominantes de detectar fluorocromos: pela inclusão de corantes fluorescentes que se ligam ao DNA ou probes de nucleotídeos. Corantes fluorescentes que se ligam ao DNA como o SYBR Green, quando livres na solução, emitem o excesso de energia como vibracional, porém, quando a amplificação do alvo da PCR ocorre, essa

molécula se liga ao DNA e assume uma nova conformação, emitindo fluorescência.

A outra maneira é monitorar a reação incluindo uma sequência de oligonucleotídeos marcada ou para maior especificidade uma terceira sequência de oligonucleotídeos associada a um fluorocromo que se encaixa entre a sequência de par de primers, como por exemplo as sondas Taqman. A partir de seu desenvolvimento, foram geradas técnicas para a quantificação de microrganismos, determinação de dosagem gênica, identificação de transgenia, uso forense e detecção de câncer.

Entre estas técnicas, o limite de detecção (a menor quantidade de analito mensurável em uma amostra que pode ser detectada, entretanto não quantificável com valor exato) e posteriormente o limite de quantificação (a menor quantidade mensurável em uma amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão aceitável sob condições experimentais) foi aumentando com o desenvolvimento de novas plataformas dependendo do tipo de amostra (FOROOTAN et al., 2017).

Tais diferenças podem ser detectadas, por exemplo, em momentos de baixa parasitemia de animais portadores dos agentes da TPB, onde não é possível a detecção pelo método de esfregaço ou, até mesmo, quando a titulação de iELISA encontra-se baixa devido à evasão do sistema imune do hospedeiro por parte dos parasitas. É neste momento que as técnicas de PCR e qPCR se destacam, detectando pequenas quantidades nas amostras de DNA genômico (gDNA) extraído do sangue.

Objetivo

Este estudo teve como objetivo correlacionar o número de carrapatos com a estimativa de infecção resultante da quantificação dos agentes da TPB utilizando a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) pela detecção dos genes *msp5* (*A. marginale*), *cbisg* (*B. bigemina*) e *cbosg* (*B. bovis*) em bovinos da raça Brangus e Nelore sem o uso de tratamento acaricida no Cerrado brasileiro durante o período de um ano.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADL, S. M.; SIMPSON, A. G.; LANE, C. E.; LUKES, J.; BASS, D.; BOWSER, S.S.; BROWN, M. W.; BURKI, F.; DUNTHORN, M.; HAMPL, V. The revised classification of eukaryotes. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, p. 429–493, 2012.

AGUIAR, D. Parasitas causam prejuízo de 18 bilhões por ano na pecuária brasileira, 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1490042/parasitas-causam-prejuizo-de-18-bilhoes-por-ano-a-pecuaria-brasileira>>. Acessado em: 05 out. 2019

AGUIRRE, D. H.; GAIDO, A. B.; VINABAL, A. E.; ECHAIDE, S. T.; GUGLIELMONE, A. A. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. **Parasite**, v. 1, n. 4, p. 405-7, 1994.

ALVES, J. A.; SOUZA-FILHO, S. D.; OLIVEIRA, H. M.; CARVALHO-NETO, J. L. Determinação de microhematócritos em centrífuga convencional. **Revista Brasileira de Análise Clínica**, v. 18, n. 2, p. 47-48, 1986.

ANDREOTTI, R.; BARROS, J.; GARCIA, M. V.; RODRIGUES, V. S.; HIGA, L. O. S.; DUARTE, P. O.; BLECHA, I. M. Z.; BONATTE-JUNIOR, P. Cattle tick infestation in Brangus cattle raised with Nellore in central Brazil. **Semina Ciências Agrárias**, v. 39, n. 3, p.1099, 2018.

AUBRY, P. & GEALE, D. W. A review of bovine anaplasmosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.58, p:1–30, 2011.

ARAMAN, S. F. (1979) Protein digestion and synthesis in ixodid females. In: Rodriguez JG (ed) Recent advances in acarology, I. Academic Press, New York, London, pp 385–395.

BACCHI, C. J.; NATHAN, H. C.; HUTNER, S. H.; DUCH, D. S.; NICHOL, C. A. Prevention by polyamines of the curative effect of amicarbalide and imidocarb for *Trypanosoma brucei* infections in mice. **Biochemical Pharmacology**, v.30, p.883-886, 1981.

BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; MYLER, P. J.; MCGUIRE, T. C. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. **Infection and Immunity**, v.55, p. 2428-2435, 1987.

BECHARA, G. H.; SZABÓ, M. J.; DUARTE, J. M. B.; MATUSHIMA, E. R.; CAMPOS PEREIRA, M.; RECHAV, Y.; KEIRANS, J. E.; FIELDEN, L. J. Ticks associated with wild animals in the Nhecolandia Pantanal, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 289-297, 2000.

BELL, E.J.; KOHLS, G. M.; STOENNER, H. G.; LACKMAN, D. B. Non-pathogenic rickettsias related to the spotted fever group isolated from ticks, *Dermacentor variabilis* and *Dermacentor andersoni* from eastern Montana. **Journal of Immunology**, v. 90, p. 770–781, 1963.

BOCK, R. E.; DE VOS, A. J.; KINGSTON, T. G.; MCLELLAN, D. J. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. **Australian Veterinary Journal**, v.75, n. 5, p.337-40, 1977.

BOCK, R. E.; KINGSTON, T. G.; DE VOS, A. J. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v.77, n.7, p.461-4, 1999.

BOONCHIT, S.; XUAN, X.; YOKOYAMA, N.; GOFF, W. L.; WAGHELA, S. D.; WAGNER, G.; IGARASHI, I. Improved enzyme-linked immunosorbent assay using C-terminal truncated recombinant antigens of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein-1 for detection of specific antibodies. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 4, p.1601–1604, 2004.

BOWIE, M. V.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. **Gene**, v. 282, n.1-2, p.95-102, 2002.

BROWN, W. C.; RICE-FITCH, A. C.; ESTES, D. M. Bovine type 1 and type 2 responses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.63, p. 45–55, 1998.

BROWN, C. B.; NORIMINE, J.; GOFF, W. L.; C. E. SUAREZ, C. E.; MCELWAIN, T. F. Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. **Parasite Immunology**, v.28, p.315–327, 2006.

BROWN, W. C.; BARBET, A. F. Persistent infections and immunity in ruminants to arthropod-borne bacteria in the family Anaplasmataceae. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 177–197, 2016.

BURGDORFER, W. & VARMA, M. G. R. 1967. Trans-stadial and transovarial development of disease agents in arthropods, p. 347–376. In R. F. Smith and T. E. Mittler (ed.), *Annual reviews of entomology*. Annual Reviews Inc., Palo Alto, California.

CABEZAS-CRUZ, A.; PASSOS, L. M. F.; LIS, K.; KENNEIL, R.; VALDÉS, J.J.; FERROLHO, J.; TONK, M.; POHL, A. E.; GRUBHOFFER, L.; ZWEYGARTH, E.; SHKAP, V.; RIBEIRO, M. F. B.; ESTRADA-PEÑA, A.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J. Functional and immunological relevance of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a sequence and structural analysis. **PLoS One**, v.8, n.6, e65243, 2013.

CAMPOS PEREIRA, M.; LABRUNA, M. B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Chapter 3. In: CAMPOS PEREIRA, M., LABRUNA, M. B., SZABÓ, M.P.J., KLAFKE, G.M. (Eds.), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência*. **Medicina Veterinária**, São Paulo, 2008.169p.

CFSPH (Center for Food Security and Public Health) (2008) Bovine babesiosis. Iowa State University, Ames.

COETZEE, J. F.; APLEY, M. D.; KOCAN, K. M.; RURANGIRWA, F. R.; VAN DONKERSGOED, J. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.61–73, 2006.

COSTA, S. C.; MAGALHÃES, V. C.; OLIVEIRA, U. V.; CARVALHO, F. S.; 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 Tick-Borne Diseases**, v. 7, n.2, p.270-5, 2016.

CURNOW, J. A. Studies on antigenic changes and strain differences in *Babesia argentina* infections. **Australian Veterinary Journal**, v.49, p.279–83, 1973.

CSORDAS, B. G.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; GIACHETTO, P. F.; BLECHA, I. M. Z.; ANDREOTTI, R. New insights from molecular characterization of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 3, p. 317-236, 2016.

DALL'AGNOL, B.; WEBSTER, A.; SOUZA, U. A.; BARBIERI, A.; MAYER, F. Q.; CARDOSO, G. A.; TORRES, T. T.; MACHADO, R. Z.; FERREIRA, C. A. S.; RECK, J. Genomic analysis on Brazilian strains of *Anaplasma marginale*. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.30, n.2, e000421, 2021.

DE CASTRO, J. J.; YOUNG, A. S.; DRANSFIELD, R. D.; CUNNINGHAM, M. P.; DOLAN, T. T. Effects of tick infestation on Boran (*Bos indicus*) cattle immunized against theileriosis in an endemic area of Kenya. **Research in Veterinary Science**, v. 9, p. 279–288, 1985.

DE CASTRO, J. J.; NEWSON, R. M. Host-resistance in cattle tick control. **Parasitology Today**, v. 9, p. 13–17, 1993.

DE LA FUENTE, J.; BUSSCHE, V. D. R. A.; GARCIA-GARCIA, J. C.; RODRIGUEZ, S. D.; GARCIA, M. A.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. **Veterinary Microbiology**, v.88, p. 275-285, 2002.

DE LA FUENTE J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; PRADO, T. M.; KOCAN, K. M. *Anaplasma marginale* msp1alpha genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. **Journal of Clinical Microbiology**; v.41, n.4, p. 1609-1616, 2003a.

DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia to host cells. *Anaplasma marginale*. **Veterinary Microbiology**; v. 91, n.2-3, p. 265-283, 2003b.

DE LA FUENTE, J.; ANTUNES, S.; BONNET, S.; CABEZAS-CRUZ, A.; DOMINGOS, A. G.; ESTRADA-PEÑA, A.; JOHNSON, N.; KOCAN, K. M.; MANSFIELD, K. L.; NIJHOF, A. M.; PAPA, A.; RUDENKO, N.; VILLAR, M.; ALBERDI, P.; TORINA, A.; AYLLÓN, N.; VANCOVA, M.; GOLOVCHENKO, M.; GRUBHOFFER, L.; CARACAPPA, S.; FOOKS, A. R.; GORTAZAR, C.; REGO, R. O. M. Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.7, 2017.

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. 777-782, 1998.

ESTRADA-PEÑA, A.; NIEVES, A.; DE LA FUENTE, J. Impact of Climate Trends on Tick-Borne Pathogen Transmission. **Frontiers in Physiology**, v.3, p.64, 2012.

ESTRADA-PEÑA, A. Carrapatos: Morfologia, fisiologia e ecologia. Medvet Ltda, São Paulo, 2017, 93p. ISBN 978-85-62451-44-7.

ENGRACIA, F. JR.; BECHARA, G. H.; TEODORO, R. L. Dermal mast cell counts in F2 Holstein X Gir crossbred cattle artificially infested with the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 1081, p.476-8, 2006.

EWING, S. A. 1981. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. p.395–423. In R. J. Hidalgo and E. W. Jones (ed.), Proceedings of the 7th National Anaplasmosis Conference. Mississippi State University, Mississippi State.

FIGUEROA, J. V.; PRECIGOUT, E.; CARCY, B.; GORENFLOT, A. Identification of common antigens in *Babesia bovis*, *B. bigemina*, and *B. divergens*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1081, p.382-396, 2006.

FOIL, L. D.; COLEMAN, P.; EISLER, M.; FRAGOSO-SANCHEZ, H.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; GUERRERO, F. D.; JONSSON, N. N.; LANGSTAFF, I. G.; LI A. Y.; MACHILA, N.; MILLER, R. J.; MORTON, J.; PRUETT, J. H.; TORR, S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Veterinary Parasitology**, v.28, n.125, p.163-81, 2004.

FOROOTAN, A.; SJÖBACK, R.; BJÖRKMAN, J.; SJÖGREEN, B.; LINZ, L.; KUBISTA, M. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). **Biomolecular detection and quantification**, v.29, n.12, p.1-6, 2017. doi: 10.1016/j.bdq.2017.04.001.

FRANZIN, A. M.; MARUYAMA, S. R.; GARCIA, G. R.; OLIVEIRA, R. P.; RIBEIRO, J. M.; BISHOP, R.; MAIA, A. A.; MORE, D. D.; FERREIRA, B. R.; SANTOS, I. K. Immune and biochemical responses in skin differ between bovine hosts genetically susceptible and resistant to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Parasites & Vectors**, v. 10, n.1, p. 51, 2017.

FUJINAGA, T.; MINAMI, T.; ISHIHARA, T. Serological relationship between a large *Babesia* found in Japanese cattle and *Babesia major*, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis*. **Research in Veterinary Sciences**, v.29, p. 230, 1980.

GARCIA, A. B. **Diversidade genética de *Anaplasma marginale* em bovinos amostrados em Itú, estado de São Paulo**. 2020. 63f, Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2020.

GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, H. N.; SANTANA, C. H.; IBELLI, A. M. G.; NEO, 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 Sao Paulo state, Brazil. **Ticks Tick-Borne Disease**, v. 7, n. 5, p. 657-662, 2016.

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

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J.R.; BARROS, A. T.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H.; LEON, A. A.; PEREIRA, J. B. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, n.2, p. 150-156, 2014.

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.125-32, 2013.

GOMES, A. Aspectos da cadeia produtiva do couro bovino no Brasil e em Mato Grosso do Sul. Divulgação CNPGC EMBRAPA, Campo Grande, MS, novembro, 2001 (Documento 127). Disponível em <http://www.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc127/08aspectos.html>

GUERRERO, F. D.; BENDELE, K. G.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E. Detection of *Babesia bigemina* infection in strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from outbreaks in south Texas. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 1-2, p. 156-163, 2007.

HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Evaluation of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 163-171, 2016.

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). **Veterinary Parasitology**, v. 154, n.3–4, p. 354-359, 2008.

IBGE (2017) Pesquisa Agrícola Municipal. Rio de Janeiro: IBGE. Sistema IBGE de Recuperação 1461 Automática sidra. Banco de Dados Agregados. Disponível em www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo9.asp.

IBELI, A.M.G.; RIBEIRO, A. R. B.; GIGLIOTTI, R.; REGITANO, L. C. A.; ALENCAR, M. M.; CHAGAS, A. C. S.; PAC, A. L.; OLIVEIRA, H. N.; DUARTE, J. M. S.; OLIVEIRA, M. C. S. Resistance of cattle of various genetic groups to the tick *Rhipicephalus microplus* and the relationship with coat traits. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 425–430, 2012.

JACKSON, A. P.; OTTO, T. D.; DARBY, A.; RAMAPRASAD, A.; XIA, D.; ECHAIDE, I. E.; FARBER, M.; GAHLOT, S.; GAMBLE, J.; GUPTA, D.; GUPTA, Y.; JACKSON, L.; MALANDRIN, L.; MALAS, T. B.; MOUSSA, E.; NAIR, M.; REID, A. J.; SANDERS, M.; SHARMA, J.; TRACEY, A.; QUAIL, M. A.; WEIR, W.; WASTLING, J. M.; HALL, N.; WILLADSEN, P.; LINGELBACH, K.; SHIELDS, B.; TAIT, A.; BERRIMAN, M.; ALLRED, D. R.; PAIN, A. The evolutionary dynamics of variant antigen genes in *Babesia* reveal a history of genomic innovation underlying host-parasite interaction. **Nucleic Acid Research**, v. 42: p. 7113-7131, 2014.

JACQUOT, M.; ABRIAL, D.; GASQUI, P.; BORD, S.; MARSOT, M.; MASSEGLIA, S.; PION, A.; POUX, V.; ZILLIOX, P.; CHAPUIS J.; VOUREH, G.; BAILLY, X. Multiple independent transmission cycles of a tick-borne pathogen within a local host community. **Scientific Reports**, v.6, n. 31273, 2016.

JONGEJAN, F. & UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, S3-S14, 2004.

JONSSON N. N.; BOCK, R. E.; JORGENSEN, W. K.; MORTON, J. M.; STEAR, M. J. Is endemic stability of tick-borne disease in cattle a useful concept? **Trends in Parasitology**, 28, 85-9, 2012.

KASHINO, S. S.; RESENDE, J.; SACCO, A. M. S.; ROCHA, C.; PROENC, L.; CARVALHO, W. A.; FIRMINO, A. A.; QUEIROZ, R.; BENAVIDES, M.; GERSHWIN, L. J.; SANTOS, I. K. F. M. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. **Experimental Parasitology**, v. 110, p. 12–21, 2005.

KAZIMIROVA, M & ŠTIBRÁNIOVÁ, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defenses and pathogen transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.3, 2013

KEMP, D. H. & BOURNE, A. *Boophilus microplus*: the effect of histamine on the attachment of cattle tick larvae: studies in vivo and in vitro. **Parasitology**, v. 80, p.487–496, 1980.

KEMP, D.H.; AGBEDE R, JOHNSTON, L.; GOUGH, J.M. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. **International Journal for Parasitology**, v.16, p. 115–120, 1986.

KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J. Co-feeding studies of ticks infected with *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v.112, p. 295–305, 2003.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; COETZEE, J. F.; EWING, S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n.2-4, p. 95-107, 2010.

KOKU, R.; HERNDON, D. R.; AVILLAN, J.; MORRISON, J.; FUTSE, J. E.; PALMER, G. H.; BRAYTONA, K. A.; NOH, S. M. Both co-infection and superinfection drive complex *Anaplasma marginale* strain structure in a natural transmission setting. **Infection and Immunity**, v.89, n.11, 2021.

KOUDSTAAL, D.; KEMP, D.H.; KERR, J.D. *Boophilus microplus* rejection of larvae from British breed cattle. **Parasitology**, v. 76, p. 370-86, 1978.

LAVIELLE, R. E.; GODOY, A. M. F.; SÁNCHEZ, J. T. Comparación del número de mastocitos, eosinófilos y melanocitos en la piel de bovinos indobrasil y F1 (Cebú x Holstein). **Veterinaria (Mexico)**, v. 16, p. 143-149, 1985.

LOBO, C. A.; CURSINO-SANTOS, J. R.; ALHASSAN, A.; RODRIGUES, M. *Babesia*: an emerging infectious threat in transfusion medicine. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, e1003387, 2013.

MACHADO, R. Z.; DA 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 Veterinária**, v. 24, n. 4, p. 438-446, 2015.

MADRUGA, C. R.; HONER, M. R.; SCHENK, M. A. M.; CURVO, J. B. E. Avaliação preliminar de parâmetros epidemiológicos da tristeza parasitária bovina no Mato Grosso do Sul (Pesquisa em Andamento n. 38). Embrapa-CNPQC, Campo Grande. p. 1-7, 1987.

MEHLHORN, H. & PETERS, W. The formation of kinetes and oocyst in *Plasmodium gallinaceum* (Haemosporidia) and considerations on phylogenetic relationships between Haemosporidia, Piroplasmida and other Coccidia. **Protistologica**, v.16, n.1, p. 135-154, 1980.

MAHONEY, D. F. & MIRRE, G. B. Bovine babesiosis: estimation of infection rates in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 1971. v. 65, n.3, 1971.

MAHONEY, D. F. & ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 5, p.292-298, 1972.

MAHONEY, D. F. & MIRRE, G. B. *Babesia argentina*: the infection of splenectomized calves with extracts of larval ticks (*Boophilus microplus*). **Research in Veterinary Sciences**, v.16, n. 1, p.112-4, 1974. PMID: 4819982.

MAHONEY, D. F. & MIRRE, G. B. The selection of larvae of *Boophilus microplus* infected with *babesia bovis* (syn *B. argentina*). **Research in Veterinary Science**, v.23, p.126-127, 1977.

MCHARDY N. (1983) The prophylactic activity of imidocarb against tick-transmitted parasitic infections. In: RUCKEBUSCH Y., TOUTAIN PL., KORITZ G.D. (eds) *Veterinary Pharmacology and Toxicology*. Springer, Dordrecht.

MCHARDY, N., WOOLLON, R. M., CLAMPITT, R. B., JAMES, J. A., CRAWLEY, R. J. Efficacy, toxicity and metabolism of imidocarb dipropionate in the treatment of *Babesia ovis* infection in sheep. **Research in Veterinary Sciences**, v.41, p.14-20, 1986.

MCELWAIN, T. F.; PALMER, G. H.; GOFF, W. L.; DAVIS, W. C.; MCGUIRE, T. C. Antibodies define multiple proteins with epitopes exposed on the surface of live *Babesia bigemina* merozoites. **Journal of Immunology**, v.138, p. 2298-2304, 1988.

MEJRI, N.; FRANSCINI, N.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. Th2 polarization of the immune response of Balb/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. **Parasite Immunology**, v. 23, p. 61–69, 2001.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Valor da Produção Agropecuária de 2021 atinge R\$ 1,129 trilhão. Disponível em: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/valor-da-producao-agropecuaria-de-2021-atinge-r-1-129-trilhao#:~:text=Valor%20da%20Produ%C3%A7%C3%A3o%20Agropecu%C3%A1ria%20de%202021%20atinge%20R%24%201%2C129%20trilh%C3%A3o,-O%20valor%20total&text=Em%202021%2C%20o%20Valor%20Bruto,\(R%24%201%2C025%20trilh%C3%A3o\).](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/valor-da-producao-agropecuaria-de-2021-atinge-r-1-129-trilhao#:~:text=Valor%20da%20Produ%C3%A7%C3%A3o%20Agropecu%C3%A1ria%20de%202021%20atinge%20R%24%201%2C129%20trilh%C3%A3o,-O%20valor%20total&text=Em%202021%2C%20o%20Valor%20Bruto,(R%24%201%2C025%20trilh%C3%A3o).)

M'FADYEAN, J. & STOCKMAN, S. A new species of piroplasm found in the blood of British cattle. **Journal of Comparative Pathology**, v.24, p. 340-354, 1911.

MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; COSTA, A. J.; ROCHA, U. F.; ARDISSON, F. A. A comparative study of lesions caused by different parasitic stages of *Boophilus microplus* (Canestrini) in the skins of naturally infested taurine and zebuine hosts. The correlation of tick resistance with mast cell counts in the host's skin. **Brazilian. Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, p. 378-383, 1992.

MOSQUEDA, J.; OLVERA-RAMÍREZ, A.; AGUILAR-TIPACAMU, G.; CANTO, G. Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. **Current Medicinal Chemistry**. v.19, p.1504-18, 2012.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v.51, p.263–273, 1986.

- MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 1, p. 169-172, 2003.
- NARASIMHAN, S.; DEPONTE, K.; MARCANTONIO, N.; LIANG, X.; ROYCE, T. E.; NELSON, K. F.; BOOTH, C. J.; KOSKI, B.; ANDERSON, J. F.; KANTOR, F.; FIKRIG, E. Immunity against *Ixodes scapularis* salivary proteins expressed within 24 hours of attachment thwarts tick feeding and impairs *Borrelia* transmission. **PLoS One**, v.16, n. 2, e451, 2007.
- NARASIMHAN, S.; KUROKAWA, C.; DEBLASIO, M.; MATIAS, J.; SAJID, A.; PAL, U.; LYNN, G.; FIKRIG, E. Acquired tick resistance: The trail is hot. **Parasite Immunology**, v.43, n.5, e12808, 2021.
- NICARETTA, J. E.; ZAPA, D. M. B.; COUTO, L. F. M.; HELLER, L. M.; CAVALCANTE, A. S. DE A.; CRUVINEL, L. B.; LOPES, W. D. Z. *Rhipicephalus microplus* seasonal dynamic in a Cerrado biome, Brazil: An update of data considering global warming. **Veterinary Parasitology**, v.296, 109506, 2021.
- NUTTALL, P.A. & M. LABUDA. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. **Parasitology**, v.129, p. S177-89, 2004.
- OBERLE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; MCGUIRE, T. C. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v.56, p. 1567-1573, 1988.
- ONYICHE, T. E.; RĂILEANU, C.; FISCHER, S.; SILAGHI, C. Global Distribution of Babesia Species in Questing Ticks: A Systematic Review and Meta-Analysis Based on Published Literature. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 230.
- OSTERKAMP, J.; WAHL, U.; SCHMALFUSS, G.; HAAS, W. Host-odor recognition in two tick species is coded in a blend of vertebrate volatiles. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 185, p. 59–67, 1999.
- PALMER, G. H.; BARBET, A. F.; KUTTLER, K. L.; MCGUIRE T. C. Detection of an *Anaplasma marginale* common surface protein present in all stages of infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.23:1078-1083, 1986.
- PIPER, E. K.; JACKSON, L. A.; BAGNALL, N.; KONGSUWAN, K.; LEW, A. E.; JONSSON, N. N. Gene expression in skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, p. 110–119, 2008.
- PIPER, K.E.; JONSSON, N.N.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A. E.; MOOLHUIJZEN, P.; VANCE, E. M.; Louise A. JACKSON, A. L. Immunological Profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* Cattle Infested with the Cattle Tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Clinical and Vaccine Immunology**, p. 1074–1086, 2009.
- PIPER, E. K.; JACKSON, L. A.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; GONDRO, C. LEW-TABOR, A. E.; JONSSON, N. N. Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. **Journal of Parasitology**, v.40, p. 431–441, 2010.
- PLUMB, D.C., 2002. Veterinary Drug Handbook. Iowa State Press, Ames, 643 pp

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. *et al. Clínica Veterinária* - Um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

RAMOS, CARLOS A.N., ARAÚJO, FLÁBIO R., SOUZA, INGRID I.F., GUEDES JR, DANIEL S., OLIVEIRA, RENATO H.M., FARIAS, THAÍS A., OLIVEIRA, JAQUELINE B., ALVES, LEUCIO C., FAUSTINO, MARIA A.G. Comparação entre diversos antígenos para o diagnóstico de *Anaplasma marginale* por ELISA. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 37-41, 2010.

RAMOS, I. A. S.; HERRERA, H. M.; FERNANDES, S. J.; AMARAL, R. B. ZANATTO, D. C. S.; DA SILVA, T. M. V.; HORTA, B. 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.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, p. 694–719, 1997.

RECK, J.; MARKS, F. S.; RODRIGUES, R. O.; SOUZA, U. A.; WEBSTER, A.; LEITE, R. C.; GONZALES, J. C.; KLAFKE, G. M.; MARTINS, J. R. Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle? **Preventive Veterinary Medicine**, v.113, n.1, p. 59-62, 2014. doi: 10.1016/j.prevetmed.2013.10.006.

RIBEIRO, M. F. B.; REIS, R. Natural exposure of calves to *Anaplasma marginale* in endemic areas of Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte**, v.33, n.1, p.63-66, 1981.

RIBEIRO, J. M. C.; MANS, B. J. TickSialoFam (TSFam): A Database That Helps to Classify Tick Salivary Proteins, a Review on Tick Salivary Protein Function and Evolution, With Considerations on the Tick Sialome Switching Phenomenon. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.10, 2020.

RISTIC, M., WATRACH, A. M. Anaplasmosis. VI. Studies and a hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. **American Journal of Veterinary Research**, v.24, p.267–276, 1963.

RIZK, M. A.; EL-SAYED, S. A. E.; EL-KHODARY, S.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Discovering the in vitro potent inhibitors against *Babesia* and *Theileria* parasites by repurposing the Malaria Box: A review. **Veterinary Parasitology**, v. 274, 2019.

RUDZINSKA, M. A.; SPIELMAN, A.; RIEK, R.F.; LEWENGRUB, S.J.; PLESMAN, J. Intraerythrocytic 'gametocytes' of *Babesia microti* and their maturation in ticks. **Canadian Journal of Zoology**, v.57, n.2, p. 424-434, 1979.

RUIZ, P. M.; PASSOS, L. M.; RIBEIRO, M. F. Lack of infectivity of a Brazilian *Anaplasma marginale* isolate for *Boophilus microplus* ticks. **Veterinary Parasitology**, v.128, n. 3-4, p.325-31, 2005.

SARLI, M.; NOVOA, M. B.; MAZZUCCO, M. N.; MOREL, N.; PRIMO, M.E; ECHAIDE, S. T.; ECHAIDE, I. E. Efficacy of long-acting oxytetracycline and imidocarb dipropionate for the chemosterilization of *Anaplasma marginale* in experimentally infected carrier cattle in Argentina. **Veterinary Parasitology: Regional Studies**, v. 23, 2021.

- SCHNITTGER, L.; RODRIGUEZ, A. E.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; MORRISON, D. A. Babesia: A world emerging. **Infectection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1788–1809, 2012.
- SHAHBAZI, P.; GHARAJALAR, N. S.; MOHEBBI, K.; TAEB, J.; FARHANG, H. H.; NIKVAND, A. A.; NOROUZI, R. First Survey on the Presence and Distribution of Oxytetracycline-Resistance Genes in Anaplasma Species. **Acta Parasitologica**, v.66, n.2, p.501-507, 2021.
- SHAPIRO, S. Z.; BUSCHER, G.; DOBBELAERE, D. Acquired resistance to *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina: Ixodidae): identification of an antigen eliciting resistance in rabbits. **Journal of Medical Entomology**, v. 2, p. 147–154, 1987.
- SHIELDS, K.; CUMMING, M.; RIOS, J.; WONG, M. T.; ZWICKER, J. I.; STRAMER, S. L.; ALONSO, C. D. Transfusion-associated *Anaplasma phagocytophilum* infection in a pregnant patient with thalassemia trait: A case report. **Transfusion**; v.55, p.719–725, 2015.
- SMITH, B. P. Medicina interna de grandes animais. 3. ed. Barueri: Manole, 2006. p. 1049-1055.
- SOJKA, D.; FRANTA, Z.; HORN, M.; CAFFREY, C. R.; MAREŠ, M.; KOPÁČEK, P. New insights into the machinery of blood digestion by ticks. **Trends in Parasitology**, v.29, n.6 p.276-85, 2013.
- SNOWBALL, G. J. The effect of self-licking by cattle in infestations of cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 7, p. 227-32, 1956.
- SPICKLER, A. R. 2018. Bovine Babesiosis. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>. < Acesso em: 21 out 2019.
- SPRINGER, A.; FICHTEL, C.; CALVIGNAC-SPENCER, S.; LEENDERTZ, F. H.; KAPPELER, P. M. Hemoparasites in a wild primate: Infection patterns suggest interaction of Plasmodium and Babesia in a lemur species. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 3, p. 385-395, 2015.
- STEWART, C. G.; IMMELMAN, A.; GRIMBEEK, P.; GRIB, D. The use of a short and long acting oxytetracycline for the treatment of *Anaplasma marginale* in splenectomized calves. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 50, p. 83–85, 1979.
- TRAGER W. Acquired immunity to ticks. **Journal of Parasitology**, v. 25, p. 57-81, 1939.
- VERÍSSIMO, J. C.; D'AGOSTINO, M. S.; PESSOA, F. F.; TOLEDO, M. L.; SANTOS, F. M. I. Length and density of filiform tongue papillae: differences between tick-susceptible and resistant cattle may affect tick loads. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 594, 2015.
- WAGLAND, B. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. Growth on previously unexposed animals. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.29, p. 401-409, 1978.
- WALL, R. & SHEARER, D. Veterinary Ectoparasites: biology, pathology and control. 2.ed. Oxford: Blackwell Science, 2001. 262 p.
- WHARTON, R. H.; UTECH, K. B. W. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of the tick numbers on cattle. **Journal Australian Entomological Society**, v. 9, n. 3, p. 171-182, 1970.

WOLDEHIWET, Z. Immune evasion and immunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. **The Veterinary Journal**, v. 175, p.37-44, 2008.

WRIGHT, I. G.; GOODGER, B. V.; BUFFINGTON, G. D.; CLARK, I. A.; PARRODI, F.; WALTISBUHL, D. J. Immunopathophysiology of babesial infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.83, p.11-13, 1989.

UILENBERG, G. Babesia—a historical overview. **Veterinary Parasitology**, v.31, p. 3-10, 2006.

VIDOTTO, M. C.; KANO, S. F.; GREGORI, F.; HEADLEY, S. A.; VIDOTTO, O. Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Paraná State, Brazil, using the msp1alpha and msp4 genes. **Journal of Veterinary Medicine, B. Infectious Diseases Veterinary Public Health**, v.53, n.9, p.404-11, 2006.

ZINTL, A.; MULCAHY, G.; SKERRETT, H. E.; TAYLOR, S. M.; GRAY, J. S. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.4, p.622-36, 2003.

4 ARTIGO 1

Experimental and Applied Acarology
<https://doi.org/10.1007/s10493-020-00514-1>



Correlation between *Rhipicephalus microplus* ticks and *Anaplasma marginale* infection in various cattle breeds in Brazil

Kauê Rodriguez Martins¹ · Marcos Valério Garcia² · Paulino Bonatte-Junior¹ ·
Pâmella Oliveira Duarte³ · Leandro Oliveira Souza de Higa³ ·
Bárbara Guimarães Csordas^{2,3} · Jacqueline Cavalcante Barros⁴ · Renato Andreotti⁴ 

Received: 19 November 2019 / Accepted: 18 June 2020
© Springer Nature Switzerland AG 2020

Correlation between *Rhipicephalus microplus* ticks and *Anaplasma marginale* infection in various cattle breeds in Brazil

Kauê Rodriguez Martins^a; Marcos Valério Garcia^b; Paulino Bonatte-Junior^a; Pâmella Oliveira Duarte^c; Leandro de Oliveira Souza Higa^c; Bárbara Guimarães Csordas^{b,c}; Jacqueline Cavalcante Barros^d; Renato Andreotti^{d,e}

^a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^b Bolsista DCR, Fundapam - Governo do Estado de Mato Grosso do Sul/Laboratório de Biologia do Carrapato, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^c Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação em doenças Infecciosas e Parasitárias, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^d Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^e Corresponding author: Renato Andreotti renato.andreotti@embrapa.br –Avenida Radio Maia, 830. Campo Grande, Mato Grosso do Sul - Brazil

Abstract

The tick *Rhipicephalus microplus* is responsible for the transmission of *Anaplasma marginale*, which causes hemolytic anemia, abortion, decreased production, and mortality in cattle in Brazil. However, *A. marginale* can also persist in cattle herds without any clinical signs. This study aimed to correlate the number of ticks with quantitative polymerase chain reaction (PCR) targeting the *msp5* gene in Brangus and Nellore cattle in the Brazilian Cerrado. All animals tested PCR positive for *A. marginale*, although Brangus cattle carried a higher *A. marginale* infection load than Nellore cattle. Moreover, both breeds showed similar weight gain and a similar serological pattern throughout the year. None of the animals showed any clinical signs of anaplasmosis during the experimental period, indicating that a low level of tick infestation may be sufficient to maintain a stable enzootic situation.

Keywords: tick; anaplasmosis; qPCR; iELISA

1. Introduction

The Brazilian Cerrado biome is rich in diversity, although over the past decades, it has been fragmented by the rapid expansion of agribusiness (reviewed by Ratter et al. 1997), thereby generating billions of dollars for Brazil. In the year 2016, according to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE 2017), 216 million cattle were raised across the country, with the mid-western states accounting for 74 million of this total.

Despite this large volume, Grisi et al. (2014) estimate an annual economic loss of \$13.96 billion when considering the various parasites that affect the cattle production chain, with the tick *R. microplus*, a vector of many diseases, accounting for \$3.24 billion of these losses.

One of those diseases is anaplasmosis, which is caused by the gram-negative bacterium *A. marginale*, an organism of the order Rickettsiales and family Anaplasmataceae (Dumler et al. 2001), an obligate intracellular parasite that chronically infects cattle and wild animals. *A. marginale* spreads through the bites of infected ticks, flies, and mosquitoes, as well as through needles and surgical instruments (Aubry and Geale 2011). In addition, *A. marginale* is part of the cattle tick fever, together with *Babesia bigemina* and *Babesia bovis*, which exert an economic impact through direct costs related to mortality and morbidity and indirect costs related to disease treatment and prevention (Madruga et al. 1986).

The ability of *A. marginale* to evade the immune system allows for a subsequent reinvasion of the host erythrocytes, which in turn allows the infection of new vectors; according to Futse et al. (2003), the rate of infection of *R. microplus* by *A. marginale* may reach 92% because they feed on the chronic carriers of the disease (Kocan et al. 1992).

However, an equilibrium can be maintained in persistently infected animals that show no clinical signs of the disease. This concept is known as enzootic stability and was proposed by Mahoney and Ross (1972) for Babesiosis. The enzootic stabilities of *A. marginale*, *B. bovis*, and *B. bigemina* have been studied in the following in several regions of Brazil (Almeida et al. 2006; Costa et al. 2018), where most of the populations show enzootic stability for at least one of the three etiological agents of cattle tick fever. However, a similar estimate to that of Smith et al. (2010) does not yet exist for *R. microplus* in crossbred animals (Brangus) that are infected with *A. marginale* in the Cerrado.

The objective of this study was to estimate *A. marginale* infection levels and the relationship between the number of ticks and the number of circulating copies of Brangus and Nellore breeds in the growing phase in the Cerrado.

2. Methodology

2.1 Area and climate

The study was conducted at the farm of the Agropecuária Sanyo group, which is located in the municipality of Água Clara, Mato Grosso do Sul, Brazil (20° 46'24'' S latitude, 52° 32'24'' W longitude, altitude of 309 m). The pasture was cultivated with *Urochloa (Brachiaria) decumbens* in sandy soil. The state of Mato Grosso do Sul has a climate that is characterized as humid tropical; the dry season lasts one to three months and has an average temperature above 18°C throughout the year. Água Clara is located in the Bolsão region of Mato Grosso do Sul. According to Flumigan et al. (2015), its climate is characterized as having a rainy season from December to February, with rainfall decreasing between March and May, after which the dry season starts; the dry season ends in August as the rainy season gradually begins, which progresses until the month of December, when it officially starts. The meteorological data were obtained from the *Centro de Monitoramento do Tempo e do Clima de Mato Grosso do Sul* (Weather and Climate Monitoring Center of Mato Grosso do Sul, CEMET/MS) from June 2016 to June 2017.

2.2 Animals and collections

All of the procedures with the animals were performed according to the standards that have been published by the *Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal* (National Council for the Control of Animal Experimentation, CONCEA), and the project was approved by the *Comissão de Ética no Uso de Animais* (Ethics Committee on Animal Use, CEUA) of Embrapa Beef Cattle, Protocols 01/2016

and 08/2014. A total of 23 animals were used (11 Brangus and 12 Nelore), with an age of approximately eight to 10 months (at the beginning of the growing phase); the animals were naturally infested and were kept at a density of 0.6 animal units per hectare; no acaricides and prophylactic treatment (for anaplasmosis and babesiosis) were performed. The collections occurred from June 2016 to June 2017 at intervals of 18 days for tick count and 36 days for blood collection. The blood was collected from the caudal vein using 4 ml Vacutainer® (BD Biociences, São Paulo, Brazil) tubes with or without ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The samples were stored at 4°C and then sent to the laboratory for processing and analysis.

2.3 Tick count

The tick count was performed according to Wharton and Utech (1970), where ticks of 4.5 to 8 mm were counted along the entire body on both sides of each animal. Subsequently, the counts from both sides of the animals were summed and divided into two homogeneous groups. Every 18 days, the number of ticks on each side was counted, and the animals were weighed on a digital scale (Coimma®, Dracena - SP) from the modal day until the end of the experiment.

2.4 gDNA extraction

Genomic DNA was extracted based on Di Pietro et al. (2011) with modifications. Briefly, 300 µl of bovine blood was used, to which 2 µl of proteinase K (20 mg/ml) and 500 µl of 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) were added in a 2 ml tube. The samples were incubated for one hour in a water bath at 65°C. After the incubation period, 800 µl of chloroform were added, and the samples were vigorously vortexed for homogenization. Then, 350 µl of protein precipitation solution were added (6 ml of potassium acetate, 1.1 ml of glacial acetic acid and 2.9 ml of water), and the samples were centrifuged for 10 min at 18,000 x g. The aqueous phase was transferred to a new tube, 1 ml of 100% ethanol at 4°C was added, and the samples were stored overnight in a freezer at -20°C for DNA precipitation. After this period, the samples were centrifuged at 13,000 rpm for 5 min, after which the supernatant was discarded, and 1 ml of 70% ethanol was added, and the samples were centrifuged again at 13,000 rpm for 2 min. Then, the pellet was dried in a digital dry bath (D130XX series, Labnet International, Inc) at 37°C, and the DNA was resuspended in 50 µl ultrapure water and eluted in a water bath for 30 min at 65°C.

The samples were quantified by spectrophotometry in a NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Only samples with A260 values above 1.8 and A280 values between 2.0 and 2.2 were used for the final dilution to 100 ng/µl and were stored in a freezer at -80°C.

2.5 PCR

The samples were screened for *A. marginale* with quantitative polymerase chain reaction (PCR) according the technique of Echaide et al. (1998) for the *msp5* gene. The following primers were used for the *msp5* gene: forward, 5'-GCATAGCCTCCCCCTCTTTC-3' - *msp5* position 254 to 273 and reverse, 5'-TCCTCGCCTTGCCCCTCAGA-3' - *msp5* position 710 to 692. The reaction mixture consisted of 2.5 µl of 10x buffer (1x), 0.75 µl of MgCl₂ (50 mM), 0.5 µl of dNTPs (2.5 mM/Invitrogen by Life Technologies™), 0.5 µl of forward and reverse primers (10 picomoles), 0.3 µl of Taq (Ludwig Biotec), 1 µl of DNA (100 ng/µl) and ultrapure water that was added to a final volume of 25 µl. The reaction followed the following

parameters: 95°C/3 min, followed by 40 cycles of 95°C/30 sec, 65°C/1 min, 72°C/45 sec, and a final extension step of 72°C/10 min. The PCR product was visualized on a 1.5% agarose gel and was stained with ethidium bromide (EtBr) using a 100 bp marker (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

2.6 qPCR

The qPCR analysis was performed as previously reported (Carelli et al. 2007). Species-specific fluorescent primers and probes for the *msp1b* gene of *A. marginale* were designed in primer3 software (forward 5'-TTGGCAAGGCAGCAGCTT-3', Probe 5'-/56-FAM/TCGGTCTAA/ZEN/CATCTCCAGGCTTTCAT and reverse 5'-TTCCGCGAGCATGTGCAT-3') and were produced by Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA). A 10 µl aliquot of the reaction mixture was loaded into each well (5 µl of iTaq, 0.5 µl of F primer, 0.5 µl of R primer, 3 µl of H₂O and 1 µl of diluted sample for a final concentration of 100 ng/µl of DNA) in duplicate. Negative controls contained ultrapure water or mix instead of the sample. The calibration curve was calculated using gBlocks® gene fragments (IDT, Coralville, Iowa, USA) that had the same size as the target fragment (95-bp sequence of the *msp1b* gene of *A. marginale*), which was diluted following manufacturer's recommendations, and the standard curve was optimal from 10⁻¹ to 10⁻¹⁰ ng/µl. After a preliminary test, concentrations of 10⁻⁵ to 10⁻¹⁰ were used in triplicate as internal controls in each 98-well plate. Samples were analyzed using the StepOne Plus™ Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) using an activation cycle of iTaq DNA polymerase at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 45 sec and an annealing/extension cycle at 60°C for 1 min. The reaction signal was recorded during the extension step, and the data were analyzed using the StepOne software v2.3.

2.7 iELISA

For antigen detection of IgG class anti-*A. marginale*, the indirect ELISA (iELISA) technique was used, following the protocol described by Machado et al. (1997) for *B. bovis* and modified for *A. marginale* by Andrade et al. (2004). Total antigen from *A. marginale*, produced by Laboratório de Imunoparasitologia da FCAV/UNESP Jaboticabal, in an optimal concentration of 10 µg/mL was diluted in carbonate/bicarbonate buffer 0.5 M and pH 9.6. After 12 h incubation at 4°C, the plate block was created with PBS Tween 20 (pH 7.2), adding 6% powdered skim milk (Molico®, Nestlé, Brazil). The 96-well plates (Maxisorp®; Nunc, Thermo Scientific, Brazil) were incubated for 90 min at 37°C within a moist chamber. After three washes with PBS Tween 20 buffer, the positive, negative, and reference sera were added (all diluted 1:400 in PBS Tween + 5% rabbit normal sera). The plates were then incubated at 37°C for 90 min in a moist chamber. After three washes with PBS Tween 20, the bovine anti-IgG conjugated linked to alkaline phosphatase (Sigma®, St. Louis, EUA) and diluted 1:30000 in PBS Tween + normal 5% rabbit sera were added to the plates and washed again. Then, the alkaline phosphatase substrate p-nitrophenil phosphate (Sigma®, St. Louis, MO, EUA) was diluted in 1 mg/mL diethanolamine pH 9.8 buffer. The plates were sealed in aluminum foil and incubated for 30 min at room temperature. The plates were then read at 405 nm wavelength on a micro-ELISA reader (B.T.-100; Embrabio, São Paulo, Brazil).

2.8 Copy number calculation

Using the qPCR results, the number of target DNA molecules in each reaction was calculated according to the following formula described by Ke et al. (2006): $NC(L) = [(6.022 \times 10^{23} \text{ (copies/mol)} \times \text{concentration (g/mol)}) / \text{molecular mass (g/L)}]$, where 6.022×10^{23} is Avogadro's number, and the molecular mass is the average molecular weight of double-stranded DNA (330×2) multiplied by the size of the cloned fragment.

2.9 Statistics

The R Project for Statistical Computing software (R version 3.6.1) was used for statistical analysis. A Kolmogorov-Smirnov test was performed to check data normality, and then a Mann-Whitney U test was used to compare the weight, number of ticks and copy number of *A. marginale* msp1 β for both breeds since the data did not present normal distribution. The frequencies of positive animals obtained in the iELISA and qPCR for both breeds were analyzed using a chi-square test (X^2). For all tests, p values < 0.05 were considered statistically significant.

3 Results

3.1 Field data

Only *R. microplus* ticks were observed in both breeds throughout the year, and the Brangus group (45.51 ± 20.91) had an average tick count of 4.5 more than the Nellore group (10.08 ± 2) (Fig. 2a) ($p < 0.01$). The Brangus animals had a mean weight of 231 kg (sd ± 18.06) at the beginning and 381 kg (sd ± 29.628) at the end of the experimental period (Fig. 1). The Nellore animals had a mean weight of 208 kg (sd ± 23.35) at the beginning and 389 kg (sd ± 38.44) at the end of the experimental period (Fig. 1). No statistical significance was observed for weight between breeds ($p > 0.05$). The Brangus animals had a mean monthly weight gain of 13.69 kg (sd ± 8.14), while for Nellore animals weight gain was 16.46 kg (sd ± 8.7).

The mean temperature was 24.95°C (sd ± 2.77), the humidity was 66.86% (sd ± 4.53), and the rainfall was 33.41 mm (sd ± 18.60) during the sampling period (Fig. 1).

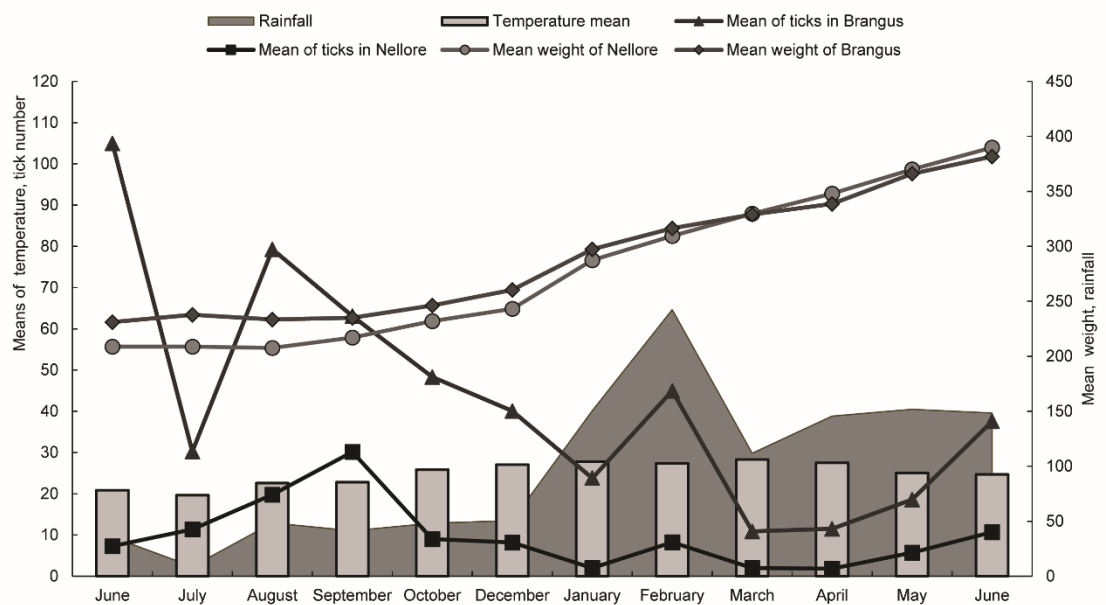


Fig. 1 Mean temperature, rainfall and number of ticks (axis and left) and mean weight of Brangus (triangle and diamond) and Nellore (square and circle) animals from June 2016 to June 2017

3.2 PCR, qPCR and ELISA

The screening of PCR samples from all animals and collections showed the presence of the *msp5* gene of *A. marginale* in the growing phase. Of the 276 qPCR samples, 275 tested positive for *A. marginale*, and the Brangus group (2758.86 ± 1205.22) had six-fold more mean copies when compared to the Nellore group (431.12 ± 425.85) ($p < 0.01$) (Table 1 and Fig. 2b).

iELISA tests for IgG were performed through 12 points in 12 months for both breeds and presented a mean optical density of 0.191 for Brangus and 0.201 for Nellore cattle. Of the 276 samples, 23.16% (11.36% Brangus and 11.80% Nellore) tested positive, but did not represent a statistically significant difference between the groups.

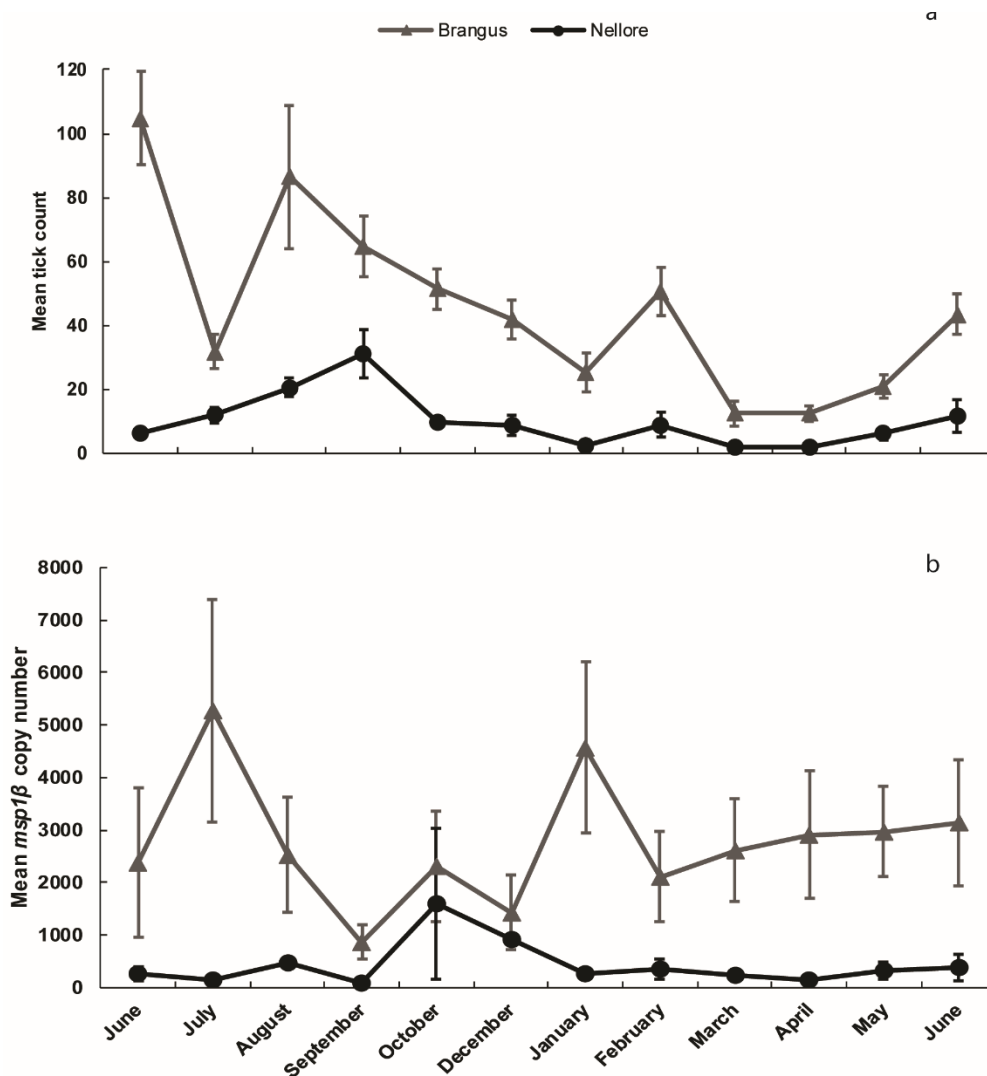


Fig. 2. Mean number of ticks (a) and mean number of copies (a) of Brangus (Triangle) and Nellore (Circle) animals from June 2016 to June 2017 at 36-day intervals

Table 1: Parameters for qPCR analysis of *A. marginale msp1* β gene obtained from gDNA extracted from Brangus (n=132) and Nelore (n=144) cattle in the period ranging from June 2016 to June 2017 in the Cerrado-MS.

	E	R ²	Slope	y-Intercept	Cq		SQ	
					Nellore	Brangus	Nellore	Brangus
Max	105.82	0.995	-3.491	41.891	36.20	38.89	1.75x10 ⁴	2.10x10 ⁴
Min	93.4	93.4	-3.19	33.285	20.84	0.00	2.18x10 ⁻¹	0.00 x10 ⁰
Mean	98.75	98,75	-3.374	38.032	26.87	26.12	5.45x10 ²	2.87x10 ³

E: efficiency of the amplification; R²: determination coefficient; Cq: quantification cycle; SQ (Starting Quantity – Starting DNA quantity: copies of a 95pb fragment from *A. marginale msp1* β gene per *A. marginale msp1* β of DNA).

4 Discussion

This study observed the development of Brangus and Nelore animals during a one-year period in the growing phase in the Brazilian Cerrado and determined the presence of the agent *A. marginale*, the number of circulating copies, the host's immune response, and the relationship of these factors to the number of ticks.

4.1 Climate and ticks

The distribution of many invertebrates is known to be regulated by temperature and rainfall, and ticks are no exception (Estrada-Peña et al. 2005; Korotkov et al. 2015).

In particular, the tick *Rhipicephalus microplus*, which has a monoxenous cycle, is distributed between 32°N and 32°S, with some sporadic outbreaks in the 35° parallel. These regions have a tropical climate, and Brazil is characterized as an endemic region for the tick *R. microplus* and the diseases that are transmitted by their feeding habits. The mean temperature and humidity throughout the period were 25°C and 66%, respectively. In the Cerrado region annually, three to four tick generations are observed, three of them in the rainy season, which occurs from October to April, months in which greater infestations occur (Gomes et al. 1989). However, we also observed in our study high tick infestations in Brangus animals within a period that coincides with the onset of the growing phase and associated stress factors (Bianchin et al. 2007), along with the dry season (Flumigan et al. 2015), possibly contributing to sufficient maintenance of the tick population during the most challenging months for its survival.

4.2 Weaning, age of animals in the growing phase and the Cerrado conditions

In areas of enzootic stability where cows are constantly infected, calves are presumed to have a greater resistance to developing TBDs because they have acquired enough antibodies through the colostrum to fight it (Madruga et al. 1987), they have greater cellular immunity and the presence of serum resistance factors (Madruga et al. 1985), and transplacental transmission could also occur (Costa et al. 2016). Although the Mato Grosso do Sul region is characterized as an area of enzootic stability, critical periods of

low humoral resistance may occur (Madruga et al. 1983). Moreover, it is possible that clinical cases of babesiosis can occur, which is a condition that is associated with anaplasmosis in the TBD complex.

However, the weaning period can generate stressful conditions that may result in immune suppression in calves (Hulbert et al. 2011). In addition, the early growing phase, which is often accompanied by animal transport stress (Trunkfield and Broom 1990; Broom, 2003), is concomitant with the beginning of the dry season in the Cerrado, especially in the state of Mato Grosso do Sul, where pasture availability is of low quality due to degradation (Andreotti et al. 2018); this factor may cause nutritional stress to the animal, suppressing its immune system even further (Carroll and Forsberg 2007). In addition to the breed of the animals, these factors that are associated with the early phase were evaluated when there is a higher occurrence of ticks, and this choice may have contributed to the large number and infestation of animals of the Brangus group. Thus, previous evaluation of tick resistance to insecticides (Drummond et al. 1973), followed by a proper method of application and product choice (Higa et al. 2019), should be considered for strategic treatment in 21-day intervals during the dry period in the Cerrado region (June to August), as suggested by Bonatte-Junior et al. (2019), to ease such effects for these animals during the growing phase.

4.3 Detection by PCR, quantification by qPCR and serology

Antibody levels detected for each animal and sample every 36 days in a one-year period showed a low percentage of positive samples and did not reflect the results obtained by PCR and qPCR analysis.

All animals of both breeds had *A. marginale* detected by the PCR technique as well as by the qPCR technique, which proved to be extremely sensitive for the detection of *A. marginale*, in a result similar to that of Carelli et al. (2007) and Giglioti et al. (2018). The mean number of circulating *A. marginale* copies was six-fold higher in the Brangus than in Nellore individuals; one possible explanation for the difference in the tick count in each breed could be if the Nellore animals had a rapid response against the ticks and were thus exposed to fewer *A. marginale*, whereas the Brangus animals may have had a higher tick load and consequently showed greater inoculation of Rickettsial agents.

However, similar to the results observed by Giglioti et al. (2016), it was possible to observe substantial fluctuation in the number of copies of *A. marginale* in the blood of these animals over time when comparing the tick infestations between blood collections (36 days). Previous studies have shown that there is no association between the number of ticks and the circulating number of copies (Giglioti et al. 2016; Giglioti et al. 2017), indicating that this factor cannot be attributed as a cause of variation. *A. marginale* infects the epithelial cells of the tick gut, then migrates through the hemolymph and colonizes the salivary glands (Kocan et al. 1992). After the primary infection and an incubation period of seven to 60 days in the host (Kocan et al. 2003; Kocan et al. 2004), a replication cycle occurs in the erythrocytes, and the infected erythrocytes are removed through the mononuclear phagocyte system. In cattle, acute infection is characterized by increasing bacteremia in infected erythrocytes, peaking at two to six weeks after infection and reaching $\leq 10^6$ bacteria per ml of blood (Eriks et al. 1993; de la Fuente et al. 2002). Those fluctuations could be attributed to *A. marginale* antigenic variation responsible for immune evasion (Graça et al. 2015) and different strains (Quiroz-Castañeda et al. 2016) within the herd and/or animal (Silva et al. 2015; Ramos et al. 20019). However, the persistent infection in hosts throughout their lifespans can be kept in circulation within the herd by other well-known agents such as tabanid horse flies (Hornok et al. 2008) and mosquitoes

(Ristic 1977) as mechanical vectors. *A. marginale* transmission by flies such as *Stomys calcitrans* cannot be discarded since they were observed during the experimental period but not collected; however, their ability to transmit this infection mechanically is questionable (Scoles et al. 2005).

The role of tick as a vector of *A. marginale* is unquestionable, but there remains a gap in the cycle, since transtadial and interstadial transmissions have been reported (Aguirre et al. 1994) but not transovarial transmission (Raoult and Roux 1997), and newborn larvae of *R. microplus* are not infected with this Rickettsia. Moreover, when larvae feed, they rarely change hosts; typically, such change behavior is performed by adult males (Kessler 2001), making the tick a multiplier of *A. marginale* through feeding on persistently infected hosts in zones of enzootic stability.

Ticks are known to promote immunosuppression at the site of their bites through secreting substances in their saliva (Perner et al. 2018) (reviewed by Kazimírová and Štibrániová 2013) and by stimulating animals' inappetence; these factors are potentiated by the number of ticks during infestation.

Few animals had specific antibodies against *A. marginale*. This fact can be attributed to the antigenic variation of *A. marginale* (Graça et al., 2015) that makes it capable of evading the immune system and chronically infecting its hosts, making them a reservoir for other vectors.

According to Eriks et al. (1993), who studied *A. marginale* in *Dermacentor andersoni*, persistently infected animals had fluctuating Rickettsia levels during the fifth week of a 24-week period, with between $< 10^4$ and 10^7 infected erythrocytes per ml of blood, and levels $< 10^4$ were maintained for four to eight days in each 5-week cycle. This fact may also be related to the highly fluctuating number of copies that were observed in this study.

Despite showing natural resistance against tick infestations, the Nellore animals presented similar rates as the Brangus animals in the ELISA test (11%), thus requiring a smaller number of ticks to generate a response similar to a Brangus individual with a mean 4.5-fold higher number of ticks.

Frisch (1999) attributed this difference to the fact that certain cattle species have already shared their environment with ticks for a long time and have consequently developed a large number of genes with smaller effects. In addition, such differences can also be explained by the long historical association between *Bos indicus* and ticks (Sutherst and Utech, 1981), self-grooming behavior (Snowball, 1956), and morphological differences (Verissimo et al. 2015).

Piper et al. (2009) showed that *Bos indicus* developed a stable T-cell-mediated response to infestation by ticks and reported its cell and leukocyte profile. *B. taurus* animals showed cellular and gene expression patterns that were consistent with an innate response, inflammatory response to infestation, and high tick-specific IgG1 titers, suggesting that these animals also develop a T-cell response to infestation. The immune responses of frequently infected animals that are exposed to antigen inoculants are sufficient to keep blood parasites at low levels without eliminating them completely from the organism (Giglioti et al. 2017). Despite the natural resistance exhibited by the Nellore animals, the present study also found variation in individuals of the same breed, as observed by Piper et al. (2009) and Andreotti et al. (2018).

4.4 Enzootic stability and breeds reared in the Cerrado

Integrated pest management can be used to achieve enzootic stability because it combines strategies of environmental manipulation and chemical and biological control and can reduce arthropod populations that are in disequilibrium (Zucchi 1990). Some strategies, such as immersion baths, do not

disturb the enzootic equilibrium (Smith et al. 2000); however, their misuse can cause a decline in the tick population for a prolonged period that is sufficient to reduce the inoculation rate necessary to maintain enzootic stability but not enough to eliminate the TBDs parasites.

According to the observations by Gomes et al. (1989), an ideal number of ticks to achieve enzootic stability in purebred Nellore animals would be an annual population of 3-4 engorged females/day. Our study observed an average of 10 engorged females/day. In turn, crossbred animals (4/8 Nellore and 4/8 European) were expected to have mean annual populations of 20-25 engorged females/day, while Ibagé animals (3/8 Nellore x 5/8 Angus) exhibited populations of 60 engorged females/day under the same conditions. The Brangus animals (3/8 Nellore and 5/8 Angus) in our study had an average of 45 engorged females/day. According to Madruga et al. (1987), crossbred animals (50% Nellore) exhibited worrying levels of weight loss, since the presence of 25 engorged females/day could result in a loss of 5.5 kg per year (Sutherst and Utech 1981). At the end of the study period, no severe weight loss was observed, and both breeds had similar weight averages (381 kg for Brangus and 389 kg for Nellore). In addition, location and climatic variation can greatly affect enzootic stability, as demonstrated by previous researchers (Smith et al. 2000) who observed that sites with fewer generations of ticks per year may present moments of instability because there are periods when the tick population is relatively small, and thus, there is no minimum level of parasite inoculation.

Andreotti et al. (2018) showed that crossbred animals (Brangus) have higher rates of infestation by ticks, even when they are reared with Zebu animals. Throughout the year, the infection rate by *A. marginale* remains constant, as corroborated by data presented by Giglioti et al. (2018); thus, maintaining tick infestation at low levels may be advantageous for the herd when the animals are exposed at early ages, as this is the period when the immune system is maturing and responds more efficiently (Madruga et al. 1983). However, in situations of stress such as unfavorable environmental conditions, the weaning phase, and poor nutrition due to poor quality pastures, this strategy may have the reverse effect and lead to the development of anaplasmosis and other diseases.

5 Conclusion

Despite the higher number of ticks, no relation of a standard number of circulating copies of *A. marginale* per tick could be achieved due to interactions of the host and bacteria evasion mechanisms.

No relation between the number of ticks and number of copies in naturally infested and untreated Brangus animals in the growing phase in the Cerrado were found. There were no clinical signs of disease and no apparent losses in population weight gain throughout the year.

Therefore, the maintenance of enzootic stability by maintaining a low number of ticks in contact with the bovine population and combining this stability with the strategic control of the TBDs vectors could help maintain enzootic equilibrium, preventing moments of enzootic instability and the emergence of clinical signs of TBDs. Although the literature data about certain vectors (primarily mosquitoes and flies) and *A. marginale* transmission has long existed, new studies should be conducted due to changes in habitat (such as degradation), climate, and vector population dynamics.

6 Acknowledgments

The authors thank Agropecuária Sanyo and Ernesto Lyo Nakashima. This study was financed in part by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) -Finance Code 001", the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the Foundation for Support to the Development of Education, Science and Technology of Mato Grosso do Sul (Fundect, MS) – State Government of Mato Grosso do Sul.

7 Author contributions

R.A. led the study conception and fund raising. All authors contributed to the study design. Material preparation, data collection, and analysis were performed by K.R.M., L.S.O.H., P.B.JR., M.V.G., P.O.D., B.G.C., and J.B.C. The first draft of the manuscript was written by K.R.M., and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

8 References

- Andrade GM, Machado RZ, Vidotto MC, Vidotto O (2004) Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the Jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1026:257-266. <https://doi.org/10.1196/annals.1307.040>
- Aguirre DH, Gaido AB, Vinabal AE, De Echaide ST, Guglielmone AA (1994) Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. Parasite 1(4): 405-7. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/1994014405>
- Almeida MBD, Tortelli FP, Riet-Correa B, Ferreira JLM, Soares MP, Farias NAR, et al. (2006) Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. Pesq Vet Bras 26: 237-242. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2006000400008>
- Andreotti R, Barros J, Valerio GM, Rodrigues SV, Higa, L, Duarte OP, et al. (2018) Cattle tick infestation in Brangus cattle raised with Nellore in central Brazil. Semina 39(3): 1099-1115. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n3p1099>
- Aubry P, Geale DW (2011) A review of bovine anaplasmosis. Transbound Emerg Dis 58(1): 1-30. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>
- Bianchin I, Catto BJ, Kichel NA, Torres AA, Honer MR (2007) The effect of the control of endo- and ectoparasites on weight gains in crossbred cattle (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) in the central region of Brazil. Trop Anim Health Prod 39(4):287-96
- Bonatte-Junior P, Rodrigues VS, Garcia MV, Higa LOS, Zimmermann NP, Barros JC, et al. (2019) Economic performance evaluation of Brangus and Nellore cattle breed naturally infested with *Rhipicephalus microplus* in an extensive production system in Central-West Brazil. Exp Appl Acarol 78: 565. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00404-1>

- Broom D. Transport stress in cattle and sheep with details of physiological, ethological and other indicators. Dtsch Tierarztl Wochenschr 2003, 110(3):83-9. PMID: 1273110
- Carelli G, Decaro N, Lorusso A, Elia G, Lorusso E, Mari V, et al. (2007) Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. Vet Microbiol 124(1-2):107-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.022>
- Carroll JA, Forsberg NE (2007) Influence of Stress and Nutrition on Cattle Immunity. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 23(1):105-149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.01.003>
- Costa SCL, de Magalhães VCS, de Oliveira UV, Carvalho FS, de Almeida CP, Machado RZ et al. (2016) 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 Tick Borne Dis 7(2): 270-275. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.11.001>
- Costa VMM, Ribeiro MFB, Duarte GAFP, Soares JF, Azevedo SS, Barros ATM, et al. (2018) Incidência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros no semiárido paraibano. Pes Vet Bras 38:605-612. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-4786>
- De la Fuente J, Bussche VDRA, Garcia-Garcia JC, Rodriguez SD, Garcia MA, Guglielmone AA, et al. (2002) Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. Vet Microbiol 2002. 88: 275-285. DOI: 10.1016/s0378-1135(02)00122-0
- Di Pietro F, Ortenzi F, Tilio M, Concetti F, Napolioni V (2011) Genomic DNA extraction from whole blood stored from 15- to 30-years at -20 C by rapid phenol-chloroform protocol: A useful tool for genetic epidemiology studies, Mol Cell Probes 25(1): 44-48. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.10.003>
- Drummond RO, Ernst SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH (1973) *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. J Econ Entomol 66 (1): 130-133. <http://dx.doi.org/10.1093/jee/66.1.130>
- Dumler J.S, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et al. (2001) Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. Int J Syst Evol Microbiol 51(6): 2145-2165. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>
- Echaide AT, Knowles DP, Mcguire TC, Palmer GH, Suarez CE, Mcelwain TF (1998) 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 36(6): 777-782

- Eriks IS, Stiller D, Palmer GH (1993) Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. J Clin Microbiol 31(8):2091-2096
- Estrada-Peña A, Acedo CS, Quílez J, Del Cacho E (2005) A Retrospective Study of Climatic Suitability for the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the Americas. Global Ecology and Biogeography 14(6): 565-573. <https://doi.org/10.1111/j.1466-822X.2005.00185.x>
- Flumignan DL, Fietz CR, Comunello E (2015) O clima na região do Bolsão de Mato Grosso do Sul. Dourados: EMBRAPA Agropecuária do Oeste. 42 p. (Documentos EMBRAPA Agropecuária do Oeste, 127)
- Frisch JE (1999) Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. Int J Parasitol 29: 57-71. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00177-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00177-5)
- Giglioti R, Oliveira HN, Santana CH, Ibelli AMG, Neo TA, Bilhassi TB, et al (2016) *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of Sao Paulo state, Brazil. Ticks Tick Borne Dis 7(5): 657-662. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.011>
- Giglioti R, Oliveira HN, Ibelli AMG, Bilhassi TB, Neo TA, Santana CH, et al. (2017) Neither quantification by qPCR nor quantitative Elisa can be used to discriminate Angus cattle for resistance/susceptibility to *Babesia bovis*. Ticks Tick Borne Dis 8(3): 335-340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.11.008>
- Giglioti R, De Oliveira HN, Bilhassi TB, Portilho AI, Okino CH, Marcondes CR, et al. (2018) Estimates of repeatability and correlations of hemoparasites infection levels for cattle reared in endemic areas for *Rhipicephalus microplus*. Vet Parasitol 250: 78-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.12.010>
- Gomes A, Honer HR, Schenk MAH, Curvo JBE (1989) Populations of cattle tick (*Boophilus microplus*) on purebred Nellore, Ibague and Nellore x European crossbreds in the Brazilian savannah. Trop An Hlth Prod 21(1):20-24
- Graça T, Paradiso L, Broschat, SL, Noh, SM, Palmera GH (2015) Primary Structural Variation in *Anaplasma marginale* Msp2 Efficiently Generates Immune Escape Variants. Infect and Immun 83(11): 4178-4184. doi: 10.1128/IAI.00851-15
- Grisi L, Leite RC, Martins JR, Barros AT, Andreotti R, Cancado PH, Leon AA, et al. (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 23(2): 150-156. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014042>
- Higa LOS, Garcia MV, Rodrigues VS, Bonatte-Junior P, Piña FTB, Barros JC, Andreotti R (2019) Effects of cypermethrin, chlorpyrifos and piperonyl butoxide-based pour-on and spray acaricides on controlling the tick *Rhipicephalus microplus*. Syst App Acarol 24(2): 278-286. <https://doi.org/10.11158/saa.24.2.10>

- Hornok S, Földvári G, Elek V, Naranjo V, Farkas R, de la Fuente J (2008) Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 154(3–4): 354-359.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.019>
- Hulbert LE, Cobb CJ, Carroll JA, Ballou MA (2011) The effects of early weaning on innate immune responses of Holstein calves. *J Dairy Sci* 94(5): 2545-2456, 2011. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3983>
- IBGE (2017) Pesquisa Agrícola Municipal. Rio de Janeiro: IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática sidra. Banco de Dados Agregados. www.sidra.ibge.gov.br/bda/acervo9.asp. accessed 05 May 2019
- Kazimírová M, Štibrániová I (2013) Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol* 3: 43-43.
<http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2013.00043>
- Kessler RH (2001) Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesq Vet Bras* 21(4):177-179
- Kocan KM, Stiller D, Goff WL, Claypool PL, Edwards W, Ewing SA, et al (1992) Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. *Am J Vet Res* 53(4): 499-507
- Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmone AA, Meléndez RD (2003) Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin microb rev* 16(4): 698-712. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.16.4.698-712.2003>
- Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC (2004) *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology* 129: S285-300
- Korotkov Y, Kozlova T, Kozlovskaya L (2015) Observations on changes in abundance of questing *Ixodes ricinus*, castor bean tick, over a 35-year period in the eastern part of its range (Russia, Tula region). *Med Vet Entomol* 29(2): 129-36. <http://dx.doi.org/10.1111/mve.12101>
- Machado RZ, Montassier HJ, Pinto AA, Lemos EG, Machado MR, Valadao IF, et al. (1997) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Vet Parasitol* 71(1): 17-26. PMID: 9231985
- Madrugá CR, Aycardi EI, Put N (1983) Epidemiologia da anaplasmosse e babesiose em bovinos da região do cerrado do Estado de Mato Grosso do Sul. *Arq Bras Med Vet Zoot* 35(5):631-640

- Madruga CR, Kessler RH, Gomes A, Schenck MAM, Andrade DE (1985) Níveis de anticorpos e parasitemia de *Anaplasma marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos Nelore. *Pes Agro Bras* 20 (1): 135-142
- Madruga CR, Berne MEA, Kessler RH, Gomes RFC, Lima JG, Schenk MAM (1986) Diagnóstico da tristeza parasitária bovina no estado de Mato Grosso do Sul: inquérito de opinião. Campinas: Fundação Cargill/EMBRAPA-CNPGC 32p
- Madruga CR, Honer MR, Schenk, MAM, Curvo JBE (1987) Avaliação preliminar de parâmetros epidemiológicos da tristeza parasitária bovina no Mato Grosso do Sul (Pesquisa em Andamento n. 38). Embrapa-CNPGC, Campo Grande. p. I-7.
<http://docsagencia.cnptia.embrapa.br/bovinodecorte/pa/pa38/pa38.pdf> accessed 10 Jun 2019
- Mahoney DF, Ross DR (1972) Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust Vet J*, 48(5): 292-298
- Perner J, Kropáčková S, Kopáček P, Ribeiro JMC (2018) Sialome diversity of ticks revealed by RNAseq of single tick salivary glands. *PLOS Negl Trop Dis* 12(4): 1-17. doi: 10.1371/journal.pntd.0006410
- Piper EK, Jonsson NN, Gondro C, Lew-Tabor AE, Moolhuijzen P, Vance ME, et al. (2009) Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Clin Vaccine Immunol* 16(7): 1074-1786. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00157-09>
- Quiroz-Castañeda RE, Amaro-Estrada I, Rodríguez-Camarillo SD (2016) *Anaplasma marginale*: Diversity, Virulence, and Vaccine Landscape through a Genomics Approach *Biomed Res Int* 2016:9032085. doi: 10.1155/2016/9032085
- Ramos IAS, Herrera HM, Fernandes SJ, Amaral RB, Zanatto DCS, et al. (2019) Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in beef cattle in the Brazilian Pantanal. *Ticks Tick-Borne Dis* 10:805-814. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.015>
- Raoult D, Roux V. (1997) Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 10(4):694-719
- Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S (1997) The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity, *Ann Bot* 80(3) 223–230. <https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0469>
- Ristic M (1977) Bovine Anaplasmosis. In: *Parasitic Protozoa*. v. 4, New York: Academic Press, pp 235-249
- Silva JB, Gonçalves LR, Varani AM, André MR, Machado RZ (2015) Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* studied longitudinally under natural transmission conditions in Rio de Janeiro, Brazil. *Ticks Tick-Borne Dis*. 7: 270–275. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.04.002>

Scoles GA, Broce AB, Lysyk TJ, Palmer GH (2005) Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). J Med Entomol 42: 668-675. DOI: 10.1603/0022-2585(2005)042[0668:REOBTO]2.0.CO;2

Smith RD, Evans DE, Martins JR, Cereser VH, Correa BL, Petraccia C, et al. (2000) Babesiosis (*Babesia bovis*) stability in unstable environments. Ann N Y Acad Sci 916: 510-20

Snowball GJ (1956) The effect of self-licking by cattle on infestation of cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust J Agric Res 7(3). <http://dx.doi.org/195610.1071/AR9560227>

Sutherst RW and Utech KBW (1981) Controlling livestock parasites with host resistance. In: CRC Handbook of pest management in agriculture. VI .2, CRC press, Boca Raton, Fla, pp385-407

Trunkfield HR, Broom DM (1990) The welfare of calves during handling and transport. Appl Anim Behav Sci 28(1): 135-152. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(90\)90050-N](https://doi.org/10.1016/0168-1591(90)90050-N)

Verissimo CJ, D'Agostino SM, Pessoa FF, De Toledo LM, Santos IK (2015) Length and density of filiform tongue papillae: differences between tick-susceptible and resistant cattle may affect tick loads. Parasit Vectors 8: 594. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1196-4>

Wharton, RH, Utech, KBW (1970) The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of the tick numbers on cattle. J Aust Entomo Soci 9(3), 171-182

Zucchi RA (1990) A taxionomia e o manejo de pragas. In: CRÓCOMO WB (org). Manejo integrado de pragas, UNESP, São Paulo, pp. 57-69

5 ARTIGO 2 – Submetido para revista Parasites & Vectors

Seasonal fluctuations in *Babesia bigemina* and *Rhipicephalus microplus* in Brangus and Nellore cattle reared in the Cerrado biome, Brazil

Abstract

Background: *Rhipicephalus microplus* (Ixodida: Ixodidae, Canestrini, 1888) is a tick that causes great economic and health losses related to the cattle industry and is the main vector of *Babesia bigemina* (Piroplasmidae: Babesidae, Smith & Kilborne, 1893). *B. bigemina* is responsible for a tick-borne disease known as babesiosis that can cause hemolytic anemia, fever, and death. This study investigated the relationship between the number of ticks per animal and the number of *B. bigemina* *cbisg* gene copies in the blood of Brangus and Nellore cattle reared without acaricidal treatment in the Brazilian Cerrado over a one-year period.

Methods: The ticks on 19 animals (9 Brangus and 10 Nellore cattle) were counted every 18 days, and blood was collected every 36 days for 12 months. Serological samples were analyzed with iELISA. Genomic DNA (gDNA) was analyzed by PCR and qPCR. The PCR products were sequenced by the Sanger method.

Results: These two breeds showed similar weight development and no clinical signs of babesiosis. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were observed in the number of ticks and the number of *B. bigemina* *cbisg* gene copies between the breeds.

Conclusion: No babesiosis clinical signs were observed, and no correlation between the number of ticks and the number of circulating copies of *cbisg* was observed.

Keywords: Apicomplexa; babesiosis; beef cattle; bovine; tick-borne diseases.

Introduction

Babesia bigemina is a bovine hemoparasite mainly present in tropical and subtropical regions that can cause clinical signs such as hemolytic anemia, fever, occasional hemoglobinuria and death [1]. Babesiosis is transmitted by ticks [2]. *Rhipicephalus microplus* is responsible for its transmission in the Brazilian Cerrado, presenting a strong preference for cattle and causing large economic losses related to the cattle industry [3].

Bos indicus cattle present fewer engorged ticks than other types of cattle and are known as a breed resistant to tick infestation [4, 5]. They also exhibit lower *Babesia* spp. parasitemia [6] than other taurine breeds and their crosses; however, the degree of parasitism may vary with animal age and breeding system [7]. Crossbreeding with taurine cattle is used to increase the genetic propensity for weight gain and precocity in beef cattle, and Brazil's Cerrado region has increased its use of the Brangus crossbreed at the cost of lower resistance to tick infestation [8].

Moreover, the absence of a well-defined, effective and well-deployed vaccine against babesiosis [9], tick resistance to chemical control [10], the capacity for transovarial *Babesia* spp. transmission in ticks [11] and the endemism of babesiosis in Brazil render monitoring and control difficult.

This study sought to investigate the number of ticks and assess the *B. bigemina* parasitary intensity in naturally infested Brangus and Nellore cattle reared in the growth phase without any acaricide intervention in the Brazilian Cerrado.

Material and methods

The study was conducted in the municipality of Água Clara, Mato Grosso do Sul State, Brazil (20° 46'24"S 52° 32'24"W). Nineteen animals (9 Brangus and 10 Nellore cattle) in the growth phase aged eight to 10 months and with a mean weight of 219.5 kg were studied. These animals were naturally infested and kept together at a density of 0.6

animals per hectare. Acaricides were not used, and prophylactic control of tick-borne diseases (TBDs) was not performed.

Data collection was performed from June 2016 to June 2017, with intervals of 18 days between tick counts according to the method of Wharton and Utech [12]. Ticks with lengths greater than 4.5-8 mm on both sides of each animal were counted. Tick taxonomic classification was performed following the system of Pereira et al. [13]. Additionally, every 36 days, the animals were weighed on a digital scale (Coimma®, Dracena - SP) to assess animal welfare [14], and blood was harvested from the caudal vein using Vacutainer® tubes. In total, 228 samples were collected; these samples were kept at 4°C and transported to the laboratory for serum and gDNA extraction.

Genomic DNA (gDNA) was extracted from whole blood as described by Rodrigues et al. [15] using the phenol/chloroform method. The quantity and purity of each sample were estimated by spectrophotometry with a NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) according to the absorbance readings at 260 nm and the 260/280 nm absorbance ratios, respectively. Then, the 228 samples corresponding to each animal and collection time point were stored at -80°C until further use.

These gDNA samples were analyzed by PCR in duplicate following the methodology of Guerrero et al. [16] using the primers KB-18 (5'-GAT-GTA-CAA-CCT-CAC-CAG-AGT-ACC-3' forward) and KB-19 (5'-CAA-CAA-AAT-AGA-ACC-AAG-GTC-CTA-C-3' reverse), which produce a PCR product of 262 bp. Two negative controls (a blood sample extracted from a bovine healthy donor and water) and one positive control (a sample obtained from a bovine blood smear positive for *B. bigemina*) were tested.

The final product was visualized on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide (EtBr). Twelve samples yielding the expected PCR product size for *B. bigemina* were purified using a PureLink quick gel extraction kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). These DNA samples were sequenced at the Human Genome and Stem-Cell Research Center (Universidade de São Paulo – USP, Brazil) in an automatic sequencer (ABI 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems, USA) with a 48-capillary DNA analysis system. The sequenced PCR products were analyzed with MEGA X software [17], and the consensus sequences of the analyzed samples were deposited in GenBank under accession number MZ542450.1.

gDNA samples were diluted to a concentration of 100 ng/μl and subjected to qPCR analysis to quantify the circulating copies of the *cbisg* gene. Absolute quantification was performed using primers (PrimeTime® Std qPCR Assay-IDT-Integrated DNA Technologies®) based on the *B. bigemina* LK054939.1 sequence in GenBank and designed using the PrimerQuest Tool (IDT Technologies, Coralville, Iowa, USA), which generated an 88-bp product of the *cbisg* gene (forward primer 5'CGAAGTGCCCAACCATATTA-3', probe 5'-/56-FAMQCGAGTGTGT/Zen/TATCAGAGTATTAAGTGGT/3IABkFQ/-3', and reverse primer 5'TGTTCCAGGAGATGTTGATTCTT-3').

Primer-dimer formation was tested with the OligoAnalyzer tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

Specificity *in silico* was tested using the NCBI BLAST platform (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch). The organisms searched were limited to “bovine”, “human” and “babesia”.

The efficiency and reproducibility (Additional Files 1, 2 and 3) of the reaction were calculated as stated by Okino et al. [18]. Serial dilutions (1:10) from 10¹ to 10¹⁰

were used to construct a standard curve with different concentrations of synthetic DNA gBlocks® Gene Fragments (IDT, Coralville, IA, USA) containing the sequence of *B. bigemina* (5'-

TGACCTTTTATTATGTTCCAGGAGATGTTGATTCTTTCGAGTGTGTTATCAGAGTATTAAGTAACTGAGGTTAATATGGGTTGGGCACTTCGTTATTTCCATGCTCAATGTGTTTCTTTTTGCTTTTTCTTTATGATGTTACATATGTTAAAAGGTTTATG-3'

- also constructed based on the sequence under accession number LK054939.1). Positive controls and duplicate negative template and negative control samples were added to each qPCR run.

The reaction volume was 10 µL per well and consisted of 5 µL of Taqman™ Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0.5 µL of each primer (10 µM), 3 µL of Milli-Q H₂O and 1 µL of 100 ng/µL gDNA. The reactions were run in duplicate. Ultrapure water was used instead of gDNA as a negative control.

A five-point standard curve (concentrations of 10⁵ to 10¹⁰ gBlocks®) was used in triplicate as an internal control in each 96-well plate. The samples were analyzed using a StepOnePlus™ Real-Time PCR System using a *hydrolase probe* activation cycle of 95°C for 10 min followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 45 s and annealing/extension at 60°C for 1 min.

The reaction signal was recorded during the extension step, and the data were analyzed using StepOne v2.3. The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines were followed [19].

Using the qPCR results, the number of target DNA molecules in each reaction (copy number – CN) was calculated according to the method of Ke et al. [20], as follows: $CN (L) = [(6.022 \times 10^{23} \text{ (copies/mol)} \times \text{concentration (g/mol)}) / \text{molecular mass (g/L)}]$, where 6.022×10^{23} is Avogadro's number and the molecular mass is the average

molecular weight of double-stranded DNA (330×2) multiplied by the size of the cloned fragment.

For antigen detection of anti-*B. bigemina* immunoglobulin G (IgG), the indirect ELISA (iELISA) technique was used following a protocol based on that of Machado et al. [21].

Total antigen from *B. bigemina* (produced by the Immunoparasitology Laboratory of the Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences [FCAV]/São Paulo State University [UNESP] Jaboticabal) was diluted to an optimal concentration of 10 µg/mL in 0.5 M carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6). After 12 h of incubation at 4°C, blocking was performed with PBS Tween 20 (pH 7.2) and 6% powdered skim milk (Molico®, Nestlé, Brazil). The ninety-six-well plates (Maxisorp®; Nunc, Thermo Scientific, Brazil) were incubated for 90 min at 37°C within a moist chamber.

After three washes with PBS Tween 20 buffer, the positive, negative, and reference sera were added (all diluted 1:400 in PBS Tween + 5% rabbit normal serum). The plates were then incubated at 37°C for 90 min in a moist chamber. After three washes with PBS Tween 20, alkaline phosphatase-conjugated bovine anti-IgG (Sigma®, St. Louis, USA) diluted 1:30000 in PBS Tween + normal 5% rabbit serum was added, and the plates were washed again.

Then, the alkaline phosphatase substrate p-nitrophenyl phosphate (Sigma®, St. Louis, MO, USA) was diluted in 1 mg/mL diethanolamine buffer (pH 9.8). The plates were sealed in aluminum foil and incubated for 30 min at room temperature. The plates were then read at a wavelength of 405 nm on a micro-ELISA reader (B.T.-100; Embrabio, São Paulo, Brazil).

The R Project for Statistical Computing (R version 3.6.3) [22] and RStudio (8.15 build 180091) [23] were used for statistical analysis.

The Kolmogorov–Smirnov test was performed to check data normality, and then the Mann–Whitney U test was used to compare the weight, number of ticks and *B. bigemina cbisg* gene CN between the breeds because the data did not present a normal distribution.

The CNs and numbers of ticks were $\log_{10}(n+1)$ -transformed and then analyzed by Spearman's rho statistic to estimate a rank-based measure of association among the weight, $\log_{10}(\text{CN})$ and $\log_{10}(\text{ticks})$.

Results

During the sampling period, the mean environmental temperature was $24.95 \pm 2.77^{\circ}\text{C}$, the humidity was $66.86 \pm 4.53\%$, and the rainfall was 33.41 ± 18.60 mm (Fig. 1). The Brangus cattle had a mean monthly weight gain of 13.69 ± 8.1 kg; for Nellore cattle, the weight gain was 16.46 ± 8.7 kg (Fig. 1). No significant difference was observed comparing the weight mean at the start (227.22 ± 17.26 for Brangus and 209.8 ± 24.36 for Nellore) and at the end of the experiment (378.88 ± 31.59 for Brangus and 395 ± 40 for Nellore) ($p > 0.05$).

Brangus cattle had a higher tick count (45.5 ± 20.9) than did Nellore cattle (10.08 ± 2) ($p < 0.01$) (Fig. 2B). All PCR and qPCR samples detected the presence of *B. bigemina*, none were positive for *B. bovis*. When the circulating *B. bigemina cbisg* gene CNs were analyzed (Fig 2A) using qPCR, the Nellore breed presented a higher mean CN (3.25 ± 0.18) than the Brangus breed (2.5 ± 0.15) ($p = 0.005$) (Table 1).

Serological samples from each time point were analyzed by iELISA with a cutoff of 0.277. Brangus animals had 13% (15/108) positive samples, while Nellore animals had 15% (18/120) positive samples.

The Brangus breed presented a Spearman correlation of $r_s = -0.23$ between weight and CN ($p = 0.01$), a Spearman correlation of $r_s = -0.47$ between weight and tick count ($p =$

0.00), and a Spearman correlation of $r_s = 0.25$ between tick count and CN ($p = 0.01$). The Nellore breed presented a Spearman correlation of $r_s = -0.11$ between weight and CN ($p = 0.22$), a Spearman correlation of $r_s = -0.42$ between weight and tick count ($p = 0.00$), and a Spearman correlation of $r_s = 0.12$ between tick count and CN ($p = 0.16$).

Discussion

Brazil is an endemic region for cattle tick fever. Beef cattle breeders in the Cerrado region have introduced other taurine breeds into the genetic lines of their herds to increase the production of beef cattle per hectare and to meet the demand from the consumer market for higher-quality meat [24]; however, this strategy has increased the sensitivity of the animals to ticks and increased the risk for TBD outbreaks.

The Água Clara region is characterized by 3–4 tick cycles per year, three of which occur in the rainy season from October to April, when most infestations occur [25]. Our data suggest that the high tick infestation rates in Brangus cattle in the initial month of the experiment may have been related to the stress generated at the end of the weaning period and the beginning of the growth phase combined with the lower pasture quality at this time of the year in the Cerrado [8] and subsequent nutritional stress, which suppressed the immune system of the cattle [26].

No significant difference in weight was detected between the two breeds during the experimental period, but a weak negative correlation was observed between the number of ticks and body weight. As reviewed by Jonsson [27], this effect of ticks on cattle weight gain is expected and may cause economic loss over time [28].

During the experiment, larvae and nymphs were observed at the same infestation proportions in both breeds but were not quantified. Nellore animals showed few engorged tick females, which led to the end of the parasitic phase. The resistance in cattle like Nellore cattle could be associated with increased numbers of mast cells, eosinophils, and

basophils in the skin, while recruitment of neutrophils is potentially associated with tick susceptibility [4]. The increased numbers of mast cells, eosinophils, and basophils cause the release of histamines from these cells, inhibiting tick attachment and leading to itching, increased grooming and tick removal [4].

Poor correlations between *Babesia* spp. CNs and tick counts have also been observed in recent studies, suggesting that there is no correlation between these factors at the time of data collection [29, 30]. However, Giglioti et al. [31] have suggested that a high positive correlation coefficient in bovine parasitemia may be dependent on or determine the parasitemia burden for ticks.

Our results contradict previous data reported by Bilhassi et al. [32] for *Babesia* spp. indicating that pure Zebu animals should be expected to have a low number of ticks, resulting in relatively low levels of parasitemia. However, one might question the methodology proposed by Wharton and Utech [12], as only the number of engorged parasites is taken into account; nymphs also have the ability to transmit *Babesia* spp. [33] but are not counted in the methodology of Wharton and Utech [12].

Babesia bigemina can establish long-lasting chronic infections that are often accompanied by *Anaplasma marginale* and *B. bovis*, causing the TBD complex. Even if a bovine host is able to establish an immune response that controls the disease, the parasite continues to proliferate in the bloodstream at levels that may be below detection by microscopy [34]. Although no clinical signs of babesiosis were observed during the study, subclinical cases cannot be discarded.

Água Clara is a region known to be endemic for the TBD complex, and the farm on which the experiment was carried out employs an extensive production system with nursing, weaning and rearing phases.

Some studies have observed serological prevalence rates of 23% for *B. bigemina* in the State of Mato Grosso do Sul [35], 87.7-98.9% in the Pantanal region [36] and 97% in Pará State [37]. In this study, we observed low iELISA responses (13% for Brangus and 15% for Nelore cattle) that did not reflect the PCR and qPCR results. This finding could be attributed to a state of equilibrium between *B. bigemina* and the host immune system (the cattle in this study were considered to be in good nutritional condition based on the weight gain curves) due to the ability to vary the antigens expressed on the surfaces of infected red cells, thus making the host a chronic carrier [38].

Enzootic stability of babesiosis in a herd occurs when the inoculation rate from ticks is sufficient to infect most calves before innate resistance to clinical disease disappears somewhere between six and nine months of age, ensuring that most cattle are infected and immune before they reach an age at which they are susceptible to clinical disease [39]. However, Jonsson et al. [40] criticized the concept of enzootic stability and did not recommend its application to *Bos taurus indicus* or diseases that have inverse immunity because the Mahoney and Ross [39] experiments did not test these breeds and ticks, nor did they perform serological assays. Thus, the degree of suppression of the host immune response in the field could not be evaluated as a function of infestation in the present study.

Conclusions

This work analyzed field data from growth-phase animals in a extensive breeding system without acaricide treatment in an endemic environment, the Cerrado region. The system might not have been the ideal system for these observations; however, the information gained contributes to comprehension of the seasonal dynamics of *B. bigemina* and may help lead to future identification and classification of strains that are less pathogenic to herds throughout this period.

In conclusion, Nellore cattle presented lower tick counts and higher CNs of the *B. bigemina cbisg* gene than Brangus cattle. Despite the low iELISA results, the pathogen was observed to be present throughout the entire period by molecular methods. On the other hand, the two breeds showed similar weight development and no symptoms of babesiosis throughout the study period. This was the first study performed on two cattle breeds in the rearing phase in the Cerrado region to quantify tick counts and circulating *B. bigemina* CNs.

Abbreviations

Bp: base pair; gDNA: genomic deoxyribonucleic acid; *cbisg*: *Babesia bigemina* cytochrome b gene; PCR: polymerase chain reaction; qPCR: real-time quantitative polymerase chain reaction; iELISA: indirect enzyme-linked immunosorbent assay

Declarations

Acknowledgments

The authors would like to thank Francisco T. Barradas Piña, Bárbara Guimarães Csordas, and Vinicius da S. Rodrigues for assisting with this study; Ernesto H. Nakashima and Agropecuária Sanyo for providing animals; and Prof. Dra. R. Z. M. from the UNESP Embrapa Gado de Corte, CAPES, and CNPQ for the scholarships to Kauê R. M., Leandro O. S. H. and Pâmella O. D.

Funding

Availability of data and materials

The majority of the data are included in the present manuscript. The nucleotide sequences are available under accession nos. LK054939.1 and MZ542450.1 in GenBank.

Authors' contributions

KRM, MVG, JCB and RA designed the study; MVG, PB, POD, LOSH, NPZ, JCB and RA performed all sample collections; KRM and POD performed all molecular analyses; KRM, NPZ, LOSH and JCB performed statistical analyses; KRM, MVG, JCB and RA drafted the manuscript; and all authors reviewed the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The procedures with the animals were performed according to the guidelines of the Ethics Committee for Animal Experimentation (Comitê de Ética para Experimentação Animal - CEUA) (Embrapa Gado de Corte, Protocol 01/2016).

Consent for publication

Declaration of competing interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Antunes S, Rosa C, Couto J, Ferrolho J, Domingos A. Deciphering babesia-vector interactions. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7: 1–8.
2. Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR, Krause PJ, Persing DH. Babesiosis. *Clin Microbiol Ver.* 2000; 13: 451-469.
3. Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., de Barros, A.T.M., Andreotti, R., Cançado, P.H.D., et al. (2014). Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2014; 23: 150-156.
4. Tabor AE, Ali A, Rehman G, Garcia GR, Zangirolamo AF, Malardo T, Jonsson NN. Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*-host interface: A review of resistant and susceptible host responses. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; 7: 506.
5. Bonatte, P.J., Rodrigues, V.S., Garcia, M.V., Higa, L.O.S., Zimmermann, N.P., Barros, J.C., et al. Economic performance evaluation of Brangus and Nellore cattle breed naturally infested with *Rhipicephalus microplus* in an extensive production system in Central-West Brazil. *Exp App Acarol.* 2019; 78: 565–577.

6. Bock R, Kingston T, de Vos A. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. Aust Vet J. 1999; 77: 461-4.
7. Giglioti R, de Oliveira HN, Gutmanis G, Luciani GF, Azevedo BT, Fiorin CFC, et al. Correlations and repeatability between *Babesia* spp. infection levels using two dairy cattle breeding systems. Exp App Acarol. 2020; 81: 599–607.
8. Andreotti R, Barros JC, Garcia MV, Rodrigues VS, Higa LOS, Duarte PO, et al. Cattle tick infestation in Brangus cattle raised with Nellore in central Brazil. Seminina: Ciên Agrár. 2018; 39: 1099–1113.
9. Rathinasamy V, Poole WA, Bastos RG, Suarez CE, Cooke BM (2019). Babesiosis Vaccines: Lessons Learned, Challenges Ahead, and Future Glimpses. Trends Parasitol. 2019; 35: 622-635.
10. Higa LOS, Garcia MV, Barros JC, Koller WW, Andreotti R. Evaluation of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to different acaricide formulations using samples from Brazilian properties. Rev Bras Parasitol Vet. 2016; 25: 163-171.
11. Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L. Babesia and its hosts: Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. Vet Res. 2009; 40: 37.
12. Wharton RH, Utech KBW. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (canestrini) (ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. Aust J Entomol, 1970; 9: 171-182.
13. Pereira MC, Labruna MB, Szabó MPJ, Klafke GM. (2008). Taxonomia do subgênero *Boophilus* e das suas espécies. *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: biologia, controle e resistência. Pages 7-14. MedVet, São Paulo.
14. World Organization for Animal Health (OIE), 2019. Chapter 7.9 - Animal welfare and beef cattle production systems. In: Terrestrial animal health code. 28th edition, 2019. OIE, Paris.

15. Rodrigues VS, Bonatte-Junior P, Garcia MV, Higa, L.O.S., Piña, F.T.B., Zimmermann, N.P., et al. Efficacy profile of Cypermethrin and Chlorpyrifos based acaricides on *Rhipicephalus microplus* control on cattle in the rearing phase, naturally infested and exposed to tick fever agents in central Brazil. *Vet Parasitol Reg Stud Rep*. 2018; 12: 43-48.
16. Guerrero FD, Bendele KG, Davey RB, George JE. Detection of *Babesia bovis* infection in strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from outbreaks in South Texas. *Vet Parasitol*. 2007; 145: 156-163.
17. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018; 35:1547-1549.
18. Okino CH, Giglioti R, Silva M, Oliveira HN, Oliveira MCS. Comparative evaluation of DNA extraction kit, matrix sample and qPCR assays for bovine babesiosis monitoring. *Mol Biol Rep*. 2018; 45: 2671–2680.
19. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55: 611-22.
20. Ke GM, Cheng HL, Ke LY, Ji WT, Chulu JL, Liao, M.H., et al. Development of a quantitative Light cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. *J Virol Methods*. 2006; 133: 6–13.
21. Machado RZ, Montassier HJ, Pinto AA, Lemos EG, Machado MR, Valadao IF, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Vet Parasitol*. 1997; 71(1): 17-26.
22. R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

23. RStudio Team, 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA.
<http://www.rstudio.com/>
24. Lobato JFP, Freitas AK, Devincenzi T, Cardoso LL, Tarouco JU, Vieira RM, et al. Brazilian beef produced on pastures: Sustainable and healthy. *Meat Science*. 2014; 98: 336-45.
25. Gomes A, Honer HR, Schenk MAH, Curvo JBE. Populations of cattle tick (*Boophilus microplus*) on purebred Nellore, Ibague and Nellore x European crossbreds in the Brazilian savannah. *Trop Anim Health Prod*. 1989; 21: 20-24.
26. Carroll, J.A., & Forsberg, N.E. (2007). Influence of Stress and Nutrition on Cattle Immunity. *Vet Clin N Am - Food Anim Pract*. 2007; 23: 105-49.
27. Jonsson NN. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet Parasitol*. 2006; 137: 1-10.
28. Calvano, M.P.C.A., Brumatti, R.C., Garcia, M.V., Barros, J.C, et al. Economic efficiency of *Rhipicephalus microplus* control and effect on beef cattle performance in the Brazilian Cerrado. *Exp App Acarol*. 2019; 79: 459-471.
29. Giglioti R, Oliveira HN, Ibelli AMG, Bilhassi TB, Néo TA, Santana CH, et al. Neither quantification by qPCR nor quantitative Elisa can be used to discriminate Angus cattle for resistance/susceptibility to *Babesia bovis*. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017; 8: 335-340.
30. 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*. *Vet Parasitol*. 2018a; 250: 78-84.
31. Giglioti R, de Oliveira HN, Okino CH, Oliveira MCS. qPCR estimates of *Babesia bovis* and *Babesia bovis* infection levels in beef cattle and *Rhipicephalus microplus* larvae. *Exp App Acarol*. 2018b; 75: 235-240.

32. 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 Tick Borne Dis.* 2014; 5: 234–238.
33. Callow LL, Hoyte HMD. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* sp. and the cattle tick. *Aust Vet J.* 1961; 37: 381-390.
34. Böse R, Jorgensen WK, Dalglish RJ, Friedhoff KT, de Vos, AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol.* 1995; 57: 61-74.
35. Kessler RH, Madruga CR, Jesus EF, Semprebom DV. (1987). Isolamento de cepas puras de *Babesia bovis*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* em área enzoótica. *Pesqui Agropecu Bras.* 1987; 22: 747-752.
36. Madruga CR, Marques APC, Araújo FR, Miguita M, Carvalho CME, Araújo, F.S, et al. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to *Babesia bovis* in cattle and its application in an epidemiological survey in Brazil. *Pesqui Vet Bras.* 2001; 21: 72-76.
37. Silva JB, Cordeiro MD, Castro SGN, dos Santos PN, da Fonseca, AH, Reis AB, et al. Ocorrência sorológica de *Babesia bovis*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* em bovinos e bubalinos no estado do Pará, Brasil. *Semina Ciên Agrár.* 2014; 35: 2495-2500.
38. Jackson AP, Otto TD, Darby A, Ramaprasad A, Xia D, Echaide IE, et al. The evolutionary dynamics of variant antigen genes in *Babesia* reveal a history of genomic innovation underlying host-parasite interaction. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42: 7113-7131.
39. Mahoney DF, Ross DR. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust Vet J,* 1972; 48: 292-298.
40. Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK, Morton JM, Stear MJ. Is endemic stability of tick-borne disease in cattle a useful concept? *Trends Parasitol.* 2012; 28, 85-9.

Tables

Table 1: qPCR results for detection of the *B. bigemina cbisg* gene.

	E	R ²	Slope	y-Intercept	Cq		Quantitative (log ₁₀ [DNA copies])	
					Nellore	Brangus	Nellore	Brangus
Max.	103.18	1	3.349	41.89	38.10	37.27	4.91×10 ⁵	1.04×10 ³
Mean	99.0	0.990	3.345	38.14	32.72	34.10	2.23×10 ²	7.45×10 ²
Min.	96.14	0.987	3.291	33.28	28.65	24.7	9.01×10 ⁻¹	0×10 ⁰

E: efficiency of amplification; R²: coefficient of determination; Cq: quantification cycle

Figure legends

Figure 1: Mean rainfall (gray background); mean temperature (gray column); Nellore cattle mean weight (gray line and gray circles); and Brangus cattle mean weight (black line and black diamonds).

Figure 2: Mean *Babesia bigemina cbisg* gene copy numbers (log₁₀[n+1]-transformed) for Brangus (dashed gray line and gray diamonds) and Nellore (black line and black triangles) cattle (A); variations across 12 months in the mean *Rhipicephalus microplus* tick counts for Brangus (dashed gray line and gray diamonds) and Nellore (black line and black triangles) cattle (B).

Tables

Table 1: qPCR results for the detection of the *B. bigemina cbisg* gene.

	E	R ²	Slope	y-Intercept	Cq		Quantitative (Log10 DNA copies)	
					Nellore	Brangus	Nellore	Brangus
Max	103.18	1	3.349	41.89	38.10	37.27	4.91×10 ⁵	1.04×10 ³
Mean	99.0	0.990	3.345	38.14	32.72	34.10	2.23×10 ²	7.45×10 ²
Min	96.14	0.987	3.291	33.28	28.65	24.7	9.01×10 ⁻¹	0×10 ⁰

E: efficiency of amplification; R²: determination coefficient; Cq: quantification cycle;

Figures and legends

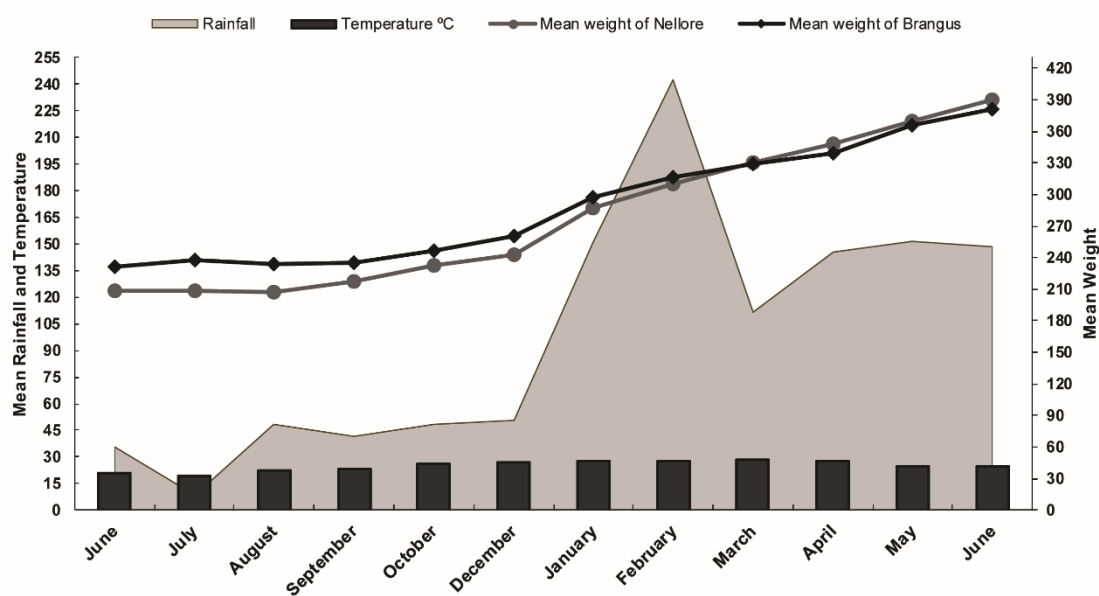


Figure 1: Mean rainfall (gray background); mean temperature (gray column); Nellore cattle mean weight (gray line and gray circle); Brangus cattle mean weight (black line and black diamond).

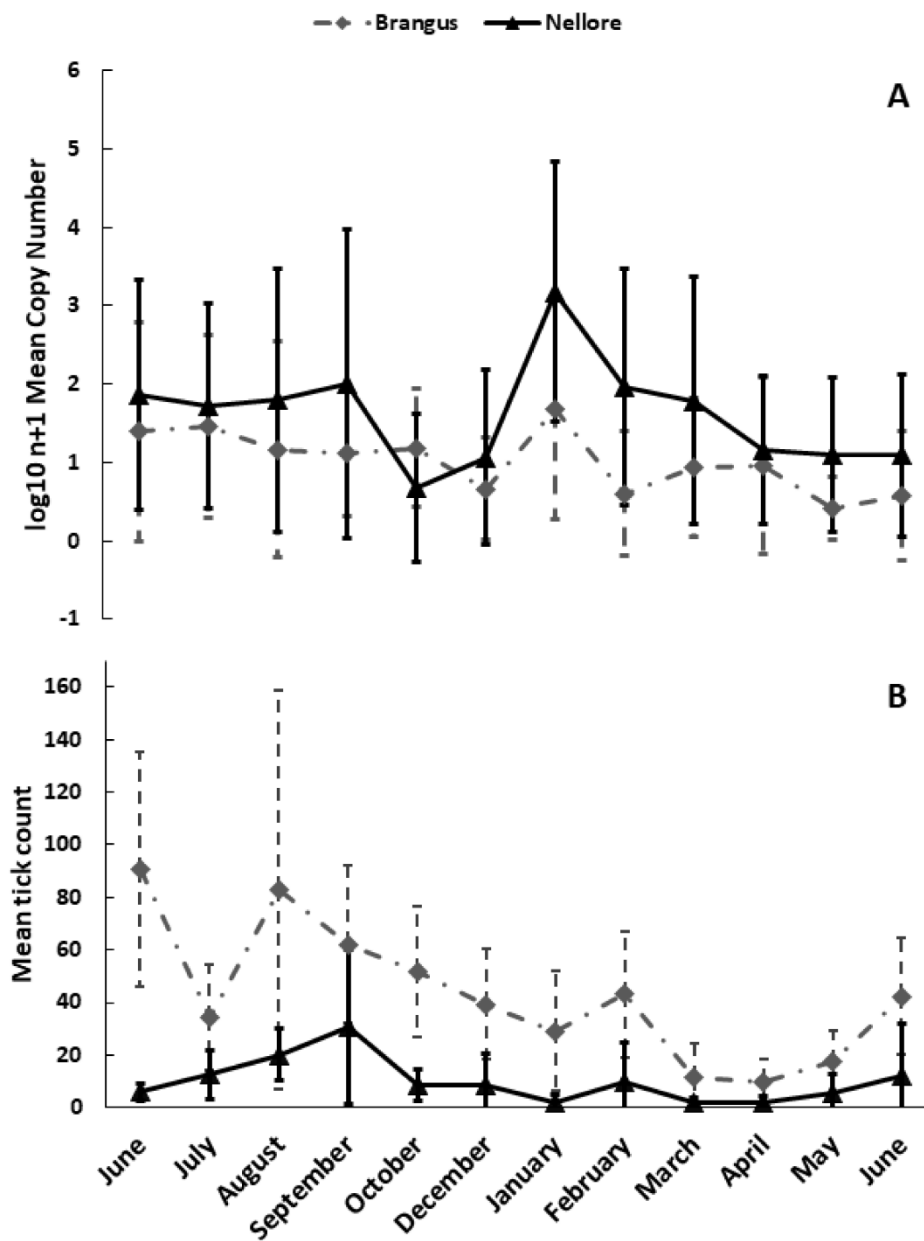


Figure 2: Mean *Babesia bigemina* cbigs gene copy number (data transformed to Log 10+1) for Brangus (dashed gray line and gray diamond) and Nellore (black line and black triangle) cattle (A); Variation across

12 months for mean *Rhipicephalus microplus* tick count for Brangus (dashed gray line and gray diamond) and Nellore (black line and black triangle) (B).

Table S1: Mean quantifying cycle and copy number obtained from each sample period for each breed

Sample month	Cq mean $\pm$ SE	Nellore	Brangus
		Mean copy log $\pm$ SE	Mean copy log $\pm$ SE
June	30,30 $\pm$ 1,89	1,86 $\pm$ 0,46	1,39 $\pm$ 0,47
July	33,12 $\pm$ 0,69	1,72 $\pm$ 0,41	1,46 $\pm$ 0,39
August	34,03 $\pm$ 0,98	1,79 $\pm$ 0,53	1,16 $\pm$ 0,46
September	33,70 $\pm$ 1,00	2,0 $\pm$ 0,62	1,11 $\pm$ 0,26
October	34,68 $\pm$ 0,79	0,67 $\pm$ 0,30	1,18 $\pm$ 0,25
December	33,95 $\pm$ 0,70	1,06 $\pm$ 0,35	0,66 $\pm$ 0,22
January	31,80 $\pm$ 0,87	3,17 $\pm$ 0,52	1,67 $\pm$ 0,47
February	33,86 $\pm$ 0,75	1,96 $\pm$ 0,48	0,60 $\pm$ 0,27
March	33,59 $\pm$ 0,64	1,78 $\pm$ 0,50	0,93 $\pm$ 0,30
April	34,13 $\pm$ 0,73	1,16 $\pm$ 0,30	0,95 $\pm$ 0,38
May	34,55 $\pm$ 0,65	1,09 $\pm$ 0,31	0,41 $\pm$ 0,14
June	34,28 $\pm$ 0,67	1,09 $\pm$ 0,33	0,58 $\pm$ 0,27

B. bigemina cBisg qPCR assays

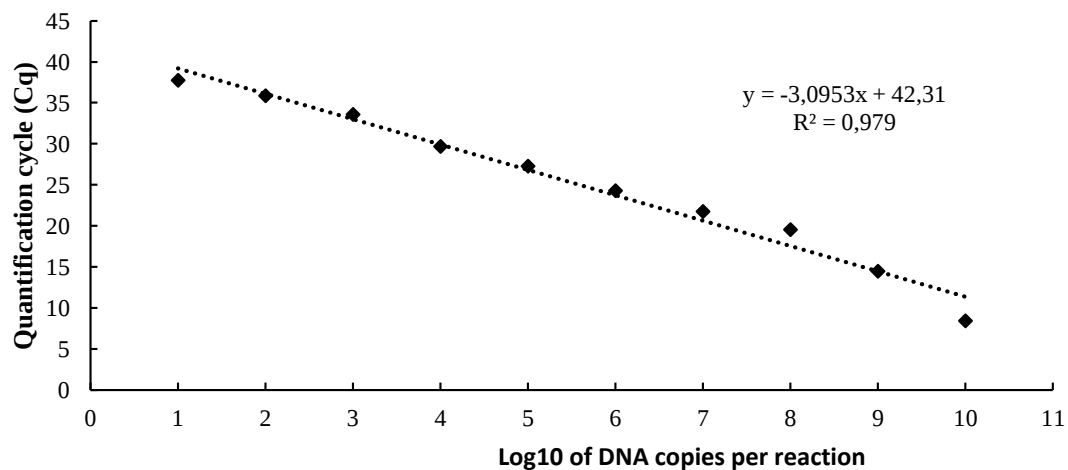


Figure S1: Current cycle (CT) vs. cBisg double strand gBlock quantity

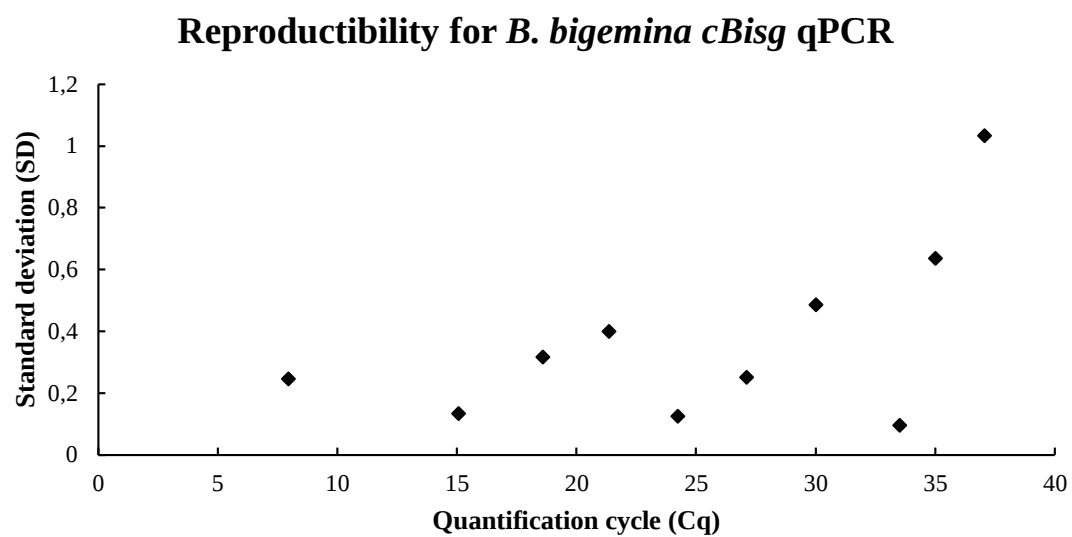


Figure S2: Quantification cycle (Cq) vs Standard deviation (SD) for *B. bigemina* *cBisg* gene copies.

6. CONSIDERAÇÕES

A da técnica de PCR e qPCR possibilitou detectar a presença e quantificar os agentes da TPB no rebanho analisado, apesar disto não foi possível atribuir correlação entre o número de cópias de cada agente e o número de carrapatos presente em cada animal.

Possivelmente a coleta e a extração de gDNA diretamente dos diversos estágios de desenvolvimento do carrapato também possibilitariam a quantificação, e uma correlação entre o hospedeiro aos moldes do estudo realizado por Gigliotti et al (2018). Além disto ainda é possível utilizar o material armazenado para caracterizar possíveis estirpes de *A. marginale* circulantes na região de Água Clara.

Os diagnósticos mais comumente utilizados, o esfregaço sanguíneo ou o microhematócrito (ALVES et al., 1986), podem não ser suficientes para detectar a presença dos agentes da TPB durante suas fases crônicas. Pode-se, então, utilizar de técnicas mais robustas e bem estabelecidas como o ELISA ou o diagnóstico molecular que apresenta uma alta precisão quanto a presença do patógeno, que já é o suficiente para tomar ações de remediação contra a ação do carrapato e seus patógenos.

7. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO

Este trabalho pode contribuir para o entendimento do comportamento dos agentes da tristeza parasitária bovina no bioma Cerrado, possibilitando uma prevenção de surtos da doença, em que manter um grupo animal minimamente infestado pode se tornar a maneira mais viável de lidar com tais surtos, mantendo a situação de estabilidade enzoótica.