

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Mayara Campos Lombardi

**Avaliação de protocolos de extração de DNA em colostro bovino e pesquisa molecular
de hemopatógenos**

Belo Horizonte
2024

Mayara Campos Lombardi

**Avaliação de protocolos de extração de DNA em colostro bovino e pesquisa molecular
de hemopatógenos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica de Ruminantes

Orientador: Elias Jorge Facury Filho

Coorientadores: Júlia Angélica Gonçalves da Silveira, Sandra Gesteira Coelho e Tiago Facury Moreira

Belo Horizonte
2024

Ficha Catalográfica

L842a Lombardi, Mayara Campos, 1989-
Avaliação de protocolos de extração de DNA em colostro bovino e pesquisa molecular de hemopatógenos/ Mayara Campos Lombardi.-2024.
124 f. il.

Orientador: Elias Jorge Facury Filho
Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Clínica de Ruminantes
Inclui Bibliografia
Inclui Anexo
Inclui Apêndice.

1. Bovino – Doenças - Teses – 2. Anaplasmosose – Teses – 3. Carrapato de bovino - Teses – I. Facury Filho, Elias Jorge- II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

MAYARA CAMPOS LOMBARDI

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS. Defesa da tese intitulada: “**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EM COLOSTRO BOVINO E PESQUISA MOLECULAR DE HEMOPATÓGENOS.**”

Aprovada em 21 de março de 2024, pela seguinte banca:

Dr.(a). Elias Jorge Facury Filho - Orientador(a)

Dr.(a). Erica Azevedo Costa

Dr.(a). Monica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Dr.(a). Moisés Dias Freitas

Dr.(a). Gustavo Henrique Ferreira Abreu Moreira



Documento assinado eletronicamente por **Silvana de Vasconcelos Cancado**, **Coordenador(a)**, em 20/02/2025, às 10:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3988432** e o código CRC **81CC62D7**.

A todos os meus familiares.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos familiares e amigos que, de alguma forma, prestaram seu suporte e apoio em algum momento de todos os meus anos de estudo, desde o começo de tudo, para que eu pudesse construir esse caminho e chegar ao dia de hoje;

Ao meu orientador de doutorado, prof. Elias Facury, pela oportunidade, imensa contribuição intelectual e profissional durante a graduação e pós-graduação. Obrigada por dividir uma pequena parte da sua grande jornada comigo;

Aos coorientadores Profa. Júlia Gonçalves, Profa. Sandra Gesteira e Prof. Tiago Facury por participarem conosco desta caminhada e toda a contribuição que trouxeram para a metodologia de processamento das análises e discussões que pautaram a construção desta tese;

Aos membros da banca examinadora Prof.a Érica Costa, Prof.a Mônica Pinho, e professores, Gustavo Moreira e Moisés Freitas, e suplentes prof. Rodrigo Meneses e Letícia Vespasiano pela disponibilidade e relevantes contribuições;

Aos sócio-proprietários e colaboradores da Fazenda Cobiça, que realizam um lindo e intenso trabalho e, gentilmente, nos receberam e auxiliaram, e disponibilizaram os animais para este estudo;

Às colegas de trabalho Rayssa Reis, Bruna Santos, Bárbara Andrade e Isadora Coelho, pela ajuda em momentos cruciais;

Aos colegas do laboratório ProtoVet e Clínica de Ruminantes pelos momentos compartilhados e todo o auxílio e tempo dispendidos para trocarmos experiências e ensinamentos, em especial à Anisleidy, à Júlia Carvalho e ao Nicolas;

Ao CNPq, FAPEMIG, FEPE-EVUFMG, pelo suporte para condução deste estudo;

À Escola de Veterinária da UFMG pelos ensinamentos e experiências adquiridos ao longo desses anos;

Ao DCCV e DMVP (EVUFMG) pela disponibilidade de infraestrutura dos laboratórios;

E a todos(as) que de algum modo contribuíram para esta realização.

Todo o meu respeito e gratidão a vocês. Espero que sempre tenhamos novas oportunidades de reencontro.

“A única coisa que lamento quanto ao meu passado é a sua duração. Se eu tivesse de viver tudo de novo, cometeria os mesmos erros, só que mais cedo.”

Tallulah Bankhead

Resumo

Em regiões tropicais e subtropicais *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina* representam grande desafio sanitário e econômico para a bovinocultura. Em adição, *Mycoplasma* spp. hemotrópico, ou hemoplasma, tem ganhado destaque entre os hemopatógenos com frequência moderada a alta em bovinos. A transmissão vertical intrauterina tem sido amplamente reportada nas últimas décadas, como mono ou coinfeções, de modo que as frequências mais altas geralmente estão associadas a infecções individuais ou mistas de *A. marginale* e hemoplasmas. Dentre as qualidades de um bom colostro, a microbiológica é de extrema relevância. A literatura relata protozoários, vírus e bactérias que podem estar presentes em secreções lácteas, porém, não há relatos de pesquisa de hemopatógenos no colostro. Hipotetizamos que o DNA de hemopatógenos possa ser detectado em colostro de vacas com PCR positivo para hemopatógenos. O objetivo do presente trabalho foi pesquisar a presença de DNA de *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina* e hemoplasmas em amostras de colostro bovino. Foram amostradas 104 vacas da raça Holandesa oriundas de propriedade leiteira comercial, região sul de Minas Gerais, Brasil, sendo 5 mL de sangue e 40 mL de colostro. Devido à ausência de protocolo padronizado e reagentes específicos para manipulação e processamento de colostro, foram avaliadas duas formas de processamento para clarificação (NaCl – protocolo 1 vs. PBS 1X – protocolo 2), anteriores à extração de DNA. A qualidade do material extraído foi avaliada em espectrofotômetro de microvolume e por reação de PCR para identificação de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O processamento com PBS 1X mostrou-se eficiente, tendo recuperado $67,03 \pm 81,64$ ng/ μ L de DNA, e apresentado os valores de 1,80, 1,66 e 1,89 para mediana, 1º quartil e 3º quartil na avaliação de razão de pureza A260/280, além de 100% das amostras positivas para GAPDH, e foi adotado para posterior pesquisa de hemopatógenos. Para diagnóstico molecular dos agentes, realizou-se a PCR ou *nested*-PCR de todas as amostras de sangue e colostro. Todos os agentes foram detectados entre as 104 amostras de sangue, tendo apresentado as frequências de 95,2%, 52,9%, 62,5% e 75,3% para *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina* e hemoplasmas, respectivamente. Nas amostras de colostro, foram detectados *A. marginale*, *B. bovis* e hemoplasmas na frequência de 12,12%, 10,9% e 6,1%. Este trabalho demonstrou pela primeira vez a presença de hemopatógenos associados à Tristeza Parasitária Bovina e hemoplasmas em amostras de colostro bovino, o que destaca a necessidade de investigação futura acerca da viabilidade dos agentes e potencial de transmissão por esta via. A alta frequência de animais positivos para hemopatógenos no sangue e surgimento das evidências em colostro reafirmam

a importância da implementação de protocolos sanitários para controle e prevenção de doenças causadas por hemopatógenos no manejo dos bovinos.

Palavras-chave: bovinocultura nos trópicos; diagnóstico molecular; processamento de colostro; tristeza parasitária bovina; transmissão vertical de patógenos

ABSTRACT

In tropical and subtropical regions, *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *B. bigemina* represent significant sanitary and economic challenges. Additionally, hemotropic *Mycoplasma* spp., also known as hemoplasma, have gained prominence among hemopathogens with moderate to high frequency in cattle. The vertical transmission in the intrauterine environment has been widely reported in recent decades, as mono or co-infections, with higher frequencies usually associated with individual or mixed infections of *A. marginale* and hemoplasmas. The literature reports protozoa, viruses, and bacteria that may be present in milk secretions; however, there are no reports of research on hemopathogens in colostrum. Considering the mechanisms of passage of maternal blood elements into the mammary gland during colostrogenesis and the hematogenous route as an important dissemination site for hemopathogens, we hypothesize that the DNA of hemoparasites may be detected in colostrum from positive cows. The aim of this study was to investigate the presence of DNA from *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina*, and hemotropic *Mycoplasma* (HM) in bovine colostrum. Blood (5mL) and colostrum (40mL) were collected from 104 Holstein cows from a commercial dairy farm in the southern region of Minas Gerais, Brazil. Due to the lack of standardized protocols and specific reagents for colostrum processing and handling, two clarification methods (NaCl – Protocol 1 vs. 1X PBS – Protocol 2) were evaluated before DNA extraction. The quality of the material extracted was evaluated using a microvolume spectrophotometer and PCR reaction for identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The protocol 2 recovered 67.03 ± 81.64 ng/ μ L of DNA and showed values of 1.80, 1.66, and 1.89 for the median, 1st quartile, and 3rd quartile in the assessment of the A260/280 purity ratio, as well as 100% of the samples testing positive for GAPDH. Therefore, it was adopted for the subsequent investigation of hemopathogens. For molecular diagnosis of the agents, PCR or nested-PCR was performed on all blood and colostrum. All agents were detected with frequencies of 95.2%, 52.9%, 62.5%, and 75.3% for *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina*, and HM, respectively. In colostrum samples, *A. marginale*, *B. bovis*, and HM were detected at frequencies of 12.12%, 10.9%, and 6.1%, respectively. This study demonstrated for the first time the presence of this hemopathogens in bovine colostrum, highlighting the need for future investigation regarding the viability of the agents and potential for transmission through this route. The high frequency of positive cows in blood and emergence of evidence in colostrum reaffirm the importance of implementing sanitary protocols for the control and prevention of diseases caused by hemopathogens in bovine management.

Key words: cattle farming in the tropics; cattle tick fever; colostrum processing; molecular diagnostics; vertical transmission of pathogens

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição mundial do vetor <i>Rhipicephalus microplus</i> 21
Figura 2	Lâmina de esfregaço sanguíneo bovino indicando (setas) estruturas basofílicas sugestivas de <i>Mycoplasma</i> spp. hemotrópicos aderidos à superfície de eritrócitos bovinos..... 22
Figura 3	Resumo do ciclo biológico de <i>Anaplasma marginale</i> e exemplo de transmissão mecânica por compartilhamento de agulha com sangue contaminado. 27
Figura 4	Resumo do ciclo biológico de <i>Babesia</i> spp. 27
Figura 5	Órgãos apontados como tecido alvo de importância para <i>Brucella</i> spp. em ruminantes..... 34
Figura 6	Perfil de produção de norepinefrina, cortisol e IGF-I em fetos expostos a estresse térmico induzido experimentalmente em ovelha 39
Figura 7	Mecanismos de síntese e passagem de moléculas e outros elementos para produção de secreção de leite e colostro em bovinos 47
Figura 8	Invasão do epitélio alveolar mamário bovino por polimorfonucleares do sistema linfocítico 48
Figura 9	Danos teciduais ao epitélio mamário em decorrência de processo inflamatório durante quadros de mastite 49
Figura 10	Concentração de células somáticas (a), albumina (b), imunoglobulina G tipo 1 (IgG1, c) e IgG2 (d) em quartos mamários infectados experimentalmente pela administração de LPS (<i>Escherichia coli</i>) 50
Figura 11	Concentração de α -lactoalbumina no sangue devido ao aumento da permeabilidade endotelial em resposta à infecção experimental com lipopolissacarídeo (LPS) observada por Wellnitz <i>et al.</i> (2015) 51

LISTA DE FIGURAS

Figura 12	Linha do tempo do desenvolvimento do sistema imune bovino 53
Figura 13	Desenvolvimento temporal do sistema imune em bovinos e estado imunológico 55
Figura 14	Subpopulações de linfócitos T e perfis de resposta comumente associados 57
Figura 15	Apresentação de antígeno a linfócito B, com participação de linfócito T auxiliar, seguida por fase de ativação e diferenciação de linfócitos B 60
Figura 16	Perfil de citocinas e características de respostas Th1 e Th2 61
Figura 17	Sistemas de criação na propriedade de condução do estudo: A) Criação de bezerros em gaiolas suspensas; B) Recria de bezerros em galpão com acesso a piquete; C) <i>Free-stall</i> com camas de areia, ventilação e aspersão; D) Pista de alimentação e piquete para gestantes e vacas seca 69
Figura 18	Vaca recém-parida em baia maternidade com cama de feno 73
Figura 19	Amostras de colostro..... 74
Figura 20	Etapas de lavagem e clarificação das amostras de colostro 77

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura e Metodologia geral

Tabela 1	Prevalência de <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e <i>Mycoplasma</i> spp. hemotrópico (<i>Mycoplasma wenyonii</i> e ‘ <i>Candidatus</i> ’ <i>Mycoplasma haemobos</i>) em rebanhos bovinos de diferentes regiões geográficas..... 24
Tabela 2	Prevalência de <i>Anaplasma marginale</i> em bezerros e 10 a 300 dias de idade, em três municípios de Minas Gerais, diagnosticada por diferentes técnicas de avaliação 32
Tabela 3	Sorotipos de <i>Salmonella</i> isolados de amostras de tecido de bezerros neonatos e fezes de bezerros e suas mães 36
Tabela 4	Prevalência de amostras de colostro positivas para <i>Mycoplasma bovis</i> em propriedades mistas, apenas de corte, e apenas de leite 44
Tabela 5	Número de amostras requeridas de acordo com a margem de erro pretendida para o estudo 72
Tabela 6	Sequência de nucleotídeos, alvo, tamanho do amplicon (pb) e referência utilizados em PCR para controle endógeno de extração de DNA de amostras de colostro bovino 79
Tabela 7	Técnica de diagnóstico molecular, sequência de iniciadores, alvo molecular e referências utilizadas para diagnóstico de <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> e micoplasmas hemotrópicos em amostras de DNA provenientes de sangue e colostro bovino 80
Capítulo I	
Table 1	Steps of two protocols (1 – commercial Physiological Solution 0.9%, and 2 – 1X PBS - phosphate buffered saline, in duplicate) used to prepare bovine colostrum samples for subsequent DNA extraction 88

Table 2	Primer, sequence of nucleotide, target gene, amplicon size, and reference to perform Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect PCR inhibitors in the colostrum sample after the DNA extraction 91
Table 3	Descriptive analysis of quality parameters evaluated in two protocols of wash and DNA extraction of bovine colostrum samples 92
LISTA DE TABELAS	
Capítulo II	
Table 1	Assay, primer sequence, target, amplicon size, and reference for <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , and hemotropic <i>Mycoplasma</i> for molecular diagnosis in blood and colostrum of dairy cows 106
Table 2	Frequency of <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , and hemotropic <i>Mycoplasma</i> spp. in the blood and colostrum of dairy cows 108
Table 3	Frequency of co-infection between <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , and hemotropic <i>Mycoplasma</i> spp. in the blood of dairy cows 109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

'Cmh'	' <i>Candidatus Mycoplasma haemobos</i> '
BC	<i>Bovine colostrum</i>
BPS	<i>Bovine parasitic sadness</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
nPCR	Reação em cadeia da polimerase - <i>Nested</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
TPB	Tristeza parasitária bovina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 HIPÓTESES	19
3 OBJETIVOS	19
3.1 Geral	19
3.2 Específicos	19
4 REVISÃO DE LITERATURA	20
4.1 Hemopatógenos de bovinos	20
4.2 Transmissão vertical de patógenos.....	30
4.3 Colostro e colostrogênese.....	46
4.4 Resposta imune à infecção por hemopatógenos.....	52
4.5 Diagnóstico molecular de agentes infecciosos no colostro	65
5 MATERIAIS E METODOLOGIA	68
6 CAPÍTULO I	83
6.1 Introduction	84
6.2 Material and Methods.....	86
6.3 Results and Discussion.....	91
6.4 Conclusions	97
7 CAPÍTULO II	98
7.1 Introduction	99
7.2 Material and Methods.....	101
7.3 Results and Discussion.....	108
7.4 Conclusions	116
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
9 CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS	118
ANEXO I	136
APÊNDICE	139

1. INTRODUÇÃO

A tristeza parasitária bovina (TPB) é um complexo de doenças que abrange anaplasmose e babesiose, causadas por agentes amplamente distribuídos em rebanhos de regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Guglielmone, 1995). Nas Américas, entre os patógenos de maior prevalência estão a riquetsia *Anaplasma marginale*, e os protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* (Guglielmone, 1995; Gray *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2021). Após a primeira infecção, os animais se tornam portadores desses agentes (Kocan *et al.*, 2010), que podem estar presentes em maior ou menor quantidade na circulação do hospedeiro ao longo da vida, de modo que a observação de eritrócitos infectados é maior durante quadros ativos da doença (Kocan *et al.* 2010; Nazifi *et al.*, 2012). Além desses agentes, bactérias da classe Mollicutes denominadas de forma genérica como micoplasmas hemotrópicos, ou hemoplasma, têm sido reportadas frequentemente, com altas porcentagens de bovino positivos em diversos países (Giroto *et al.*, 2012; Khudhair *et al.*, 2022), inclusive em coinfeções com agentes da TPB (Andrade, 2021).

De forma geral, anaplasmose, babesiose e hemoplasmoses levam à anemia, hipertermia, perda de peso, queda de desempenho, e podem evoluir para óbito. Carrapatos são considerados os vetores biológicos dos agentes da TPB, com destaque para *Rhipicephalus microplus*. No entanto, a transmissão horizontal também pode ocorrer por meio de vetores mecânicos, no caso de *A. marginale*, e para os três agentes via iatrogênica e vertical, pela via transplacentária (Kocan *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2016). Esta última vem sendo reportada na literatura científica como infecções individuais ou coinfeções, com grande destaque para transmissão de *A. marginale*, embora *B. bovis*, *B. bigemina* e micoplasmas hemotrópicos também sejam relatados (Meneses, 2013; Niethammer *et al.*, 2018; Henker *et al.*, 2020; Andrade, 2021). Nesse contexto, em estudo do presente grupo de pesquisa, a ocorrência de coinfeção por *A. marginale* e *Mycoplasma* spp. hemotrópico se mostrou elevada (Andrade *et al.*, 2024). Em geral, o diagnóstico de transmissão vertical de *B. bovis* e, especialmente de *B. bigemina*, tem sido tratado como achado isolado (Costa *et al.*, 2016), enquanto a alta ocorrência de bezerros positivos para *A. marginale* ao nascimento tem chamado a atenção para o potencial de manutenção do agente nos rebanhos por essa via.

Atualmente, o grande movimento de intensificação dos sistemas de produção de bovinos nos países em desenvolvimento no sentido de proporcionar maior conforto, bem-estar

animal e otimização do uso de áreas e recursos tem levado os animais para o interior de galpões ou piquetes com elevada carga animal (Mendonça *et al.*, 2022). Tais condições dificultam, ou mesmo impedem, a manutenção do carrapato no ambiente. Uma vez que os hemopatógenos já estejam inseridos no rebanho, espera-se que as demais vias de transmissão alcancem maior espaço e relevância na epidemiologia dessas doenças. Com o reconhecido papel da via mecânica para *A. marginale* (Kocan *et al.*, 2010), a transmissão vertical passa a se destacar como grande preocupação nesse cenário (Jasik *et al.*, 2015).

A partir dos conhecimentos adquiridos nas últimas décadas e evolução dos cuidados e manejos com os animais, tem-se a fase de cria de bezerros como um dos pontos essenciais para sucesso dos sistemas de produção, com foco no manejo de colostragem (Godden, 2008; Godden *et al.*, 2019; Lombard *et al.*, 2020; Uyama *et al.*, 2022). Contudo, é importante observar que além dos microrganismos que constituem o microbioma do colostro, é possível encontrar agentes de potencial patogênico nesta secreção. A presença de protozoários, agentes virais e bacterianos, como *Neospora caninum* (Schares *et al.*, 1998), vírus da leucose bovina (Úsuga-Monroy *et al.*, 2021), *Mycoplasma bovis* (Gille *et al.*, 2020), *Staphylococcus aureus* (Dibbern *et al.*, 2015), *Salmonella* spp. (Houser *et al.*, 2008) e *Listeria monocytogenes* (Agostini *et al.*, 2012), dentre outros, foi previamente reportada em colostro e ou leite bovino. Em alguns casos, essas secreções foram confirmadas como via de transmissão de patógenos entre vaca e bezerro, o que configura mecanismo de transmissão vertical (Úsuga-Monroy *et al.*, 2021).

Dela Cruz *et al.* (2019) identificaram DNA de *A. marginale* em amostras de leite bovino. Embora ainda não se conheçam os possíveis impactos desse achado, como viabilidade e potencial de transmissão, esta evidência gera a necessidade de investigação da presença e impacto desse e de outros hemopatógenos em colostro e leite bovinos. As pesquisas moleculares em colostro e leite são relativamente limitadas, uma vez que não há métodos e reagentes padronizados na literatura científica para esse tipo de material biológico (Caldart *et al.*, 2011; González *et al.*, 2013; Dela Cruz *et al.*, 2019). As evidências moleculares de DNA e achados relacionados a patógenos viáveis nessas secreções, associadas aos mecanismos de passagem de elementos da circulação materna para a glândula mamária durante a colostrogênese demonstram a necessidade de desenvolvimento de técnicas e reagentes para manipulação e processamento desse material.

Como última consideração, passamos pelo crescente movimento a favor do uso racional de antimicrobianos em todas as áreas da saúde e ciências agrárias (Hoelzer *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2021). Visto que, em geral, os protocolos de tratamento e profilaxia para hemopatógenos

são baseados no uso de antibióticos e antiparasitários, tal fato acrescenta motivação para a urgência de novas compreensões relacionadas à epidemiologia dessas doenças.

Diante desse cenário, os objetivos do presente trabalho foram: definir o protocolo de processamento de colostro a ser utilizado para extração de DNA e posterior diagnóstico molecular de hemopatógenos, e investigar a presença de DNA de *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina* e *Mycoplasma* spp. hemotrópico em amostras de colostro bovino.

2. HIPÓTESE

O colostro pode ser uma via de eliminação de hemopatógenos, uma vez que durante a colostrogênese a glândula mamária passa por processos que permitem passagem de elementos do sangue para o lúmen. Assim, hemácias infectadas poderiam ser transferidas do sangue para o colostro.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Ø Investigar presença de *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina* e micoplasmas hemotrópicos em amostras de colostro bovino.

3.2. Específicos

Ø Avaliar a qualidade do protocolo de clarificação, lavagem e extração de DNA de colostros bovino por meio de parâmetros previamente selecionados;

Ø Investigar a presença de *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* em amostras de sangue total bovino por diagnóstico molecular (*nested-PCR*);

Ø Investigar a presença de *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* em amostras de colostro bovino das vacas amostradas para sangue por diagnóstico molecular (*nested-PCR*);

Ø Investigar a presença de *Mycoplasma* spp. hemotrópico em amostras de sangue total bovino por diagnóstico molecular (PCR);

Ø Investigar a presença de *Mycoplasma* spp. hemotrópico em amostras de colostro bovino das vacas amostradas para sangue por diagnóstico molecular (PCR).

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Hemopatógenos de bovinos

A TPB é um complexo que reúne as doenças anaplasnose e babesiose, consideradas duas das principais doenças de bovinos associadas a carrapatos (Doyle *et al.*, 2016). A primeira é causada pela riquetsia *A. marginale*, bactéria Gram-negativa, intraeritrocitária obrigatória, pertencente à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, gênero *Anaplasma*, parasita artrópodes e mamíferos bovinos e bubalinos (Kocan *et al.*, 2010). A segunda, associada aos protozoários *B. bovis* e *B. bigemina*. A infecção por esses patógenos pode ocorrer de forma isolada ou simultânea, por dois ou três desses agentes (Ferreira *et al.*, 2022).

A infecção por *A. marginale* em bovinos ocorre estritamente nos eritrócitos maduros. Após invasão e estabelecimento da infecção, o hospedeiro pode chegar a ter até 70 % de eritrócitos infectados. Assim, a alta riquetsemia na infecção aguda é a principal responsável pela anemia severa, quando da eliminação dos eritrócitos pelo hospedeiro (Kocan *et al.*, 2002). A babesiose aguda está associada a quadros severos da doença, especialmente tratando-se de animais oriundos de rebanhos desprovidos do contato com o vetor biológico, mas também pode apresentar-se de forma crônica em animais portadores (Mosqueda *et al.*, 2012)

Com base na presença de vetores e conversão sorológica do rebanho, adaptou-se conceito aplicado à epidemiologia da *Babesia bovis* (Smith *et al.*, 1984 apud Mahoney e Ross, 1972), a fim de classificar a situação das propriedades em relação à anaplasnose em: área de estabilidade enzoótica – quando há manutenção da população de vetores biológicos e mecânicos ao longo do ano, com exposição ao agente e ocorrência de imunidade em mais de 75% dos animais em categorias de risco ou área de instabilidade enzoótica – quando os vetores não estão distribuídos ao longo do ano, com baixa exposição ao agente e ocorrência de imunidade em menos de 75 % dos animais em categorias de risco. No entanto, Jonsson *et al.* (2012) questionam a aplicabilidade desses conceitos em situações muito distintas da utilizada para determinação do conceito. Com as altas taxas de infecção congênita que vêm sendo reportadas na literatura e alteração dos sistemas de criação que afastam os animais do contato com os vetores, estudos e adaptações desse conceito parecem ser necessários (Coelho, 2022).

A TPB é um desafio constante na bovinocultura em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (África, América Central, América do Sul, algumas regiões da

América do Norte e do Sul da Europa, Ásia e Austrália), e causa severos prejuízos à saúde, desempenho e bem-estar dos animais (Brown, 2012; Zhang *et al.*, 2016; Gray *et al.*, 2019). Em geral, a TPB é endêmica em regiões em que as condições edafoclimáticas, como baixas latitudes e clima quente e úmido, permitem manutenção do vetor biológico *Rhipicephalus microplus* ou outras espécies de carrapatos ao longo do ano (**Figura 1**). Porém, é possível encontrar outras espécies do vetor em regiões de clima frio ou seco, tendo papel na epidemiologia de *Babesia* spp. (Gray *et al.*, 2019), por exemplo.

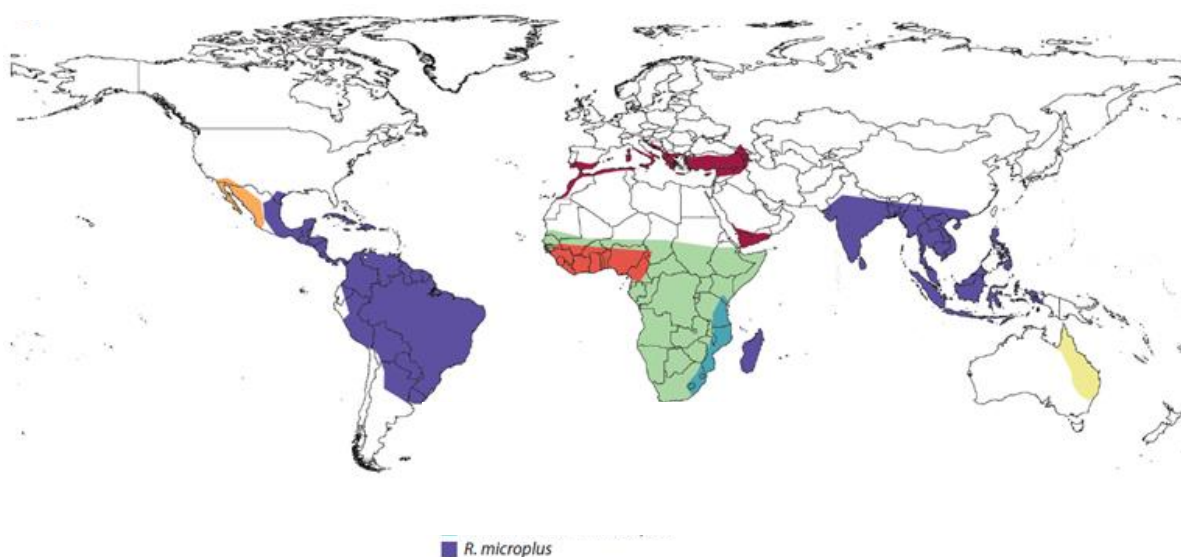


Figura 1: Distribuição mundial do vetor *Rhipicephalus microplus*. Fonte: Adaptado de Gray *et al.*, 2019.

Considerando as bactérias, além de *A. marginale*, *Mycoplasma* spp. hemotrópicos, ou hemoplasmas, têm sido relatados com cada vez mais frequência em rebanhos bovinos. Incluem-se nesse grupo bactérias epieritrocitárias (**Figura 2**) das espécies *Eperythrozoon wenyonii* (Adler and Ellenbogen, 1934), atualmente denominada *Mycoplasma wenyonii*, e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ (‘Cmh’), consideradas emergentes e responsáveis pela hemoplasmosose em bovinos (Khudhair *et al.*, 2022; Souza e Ruegg, 2023).

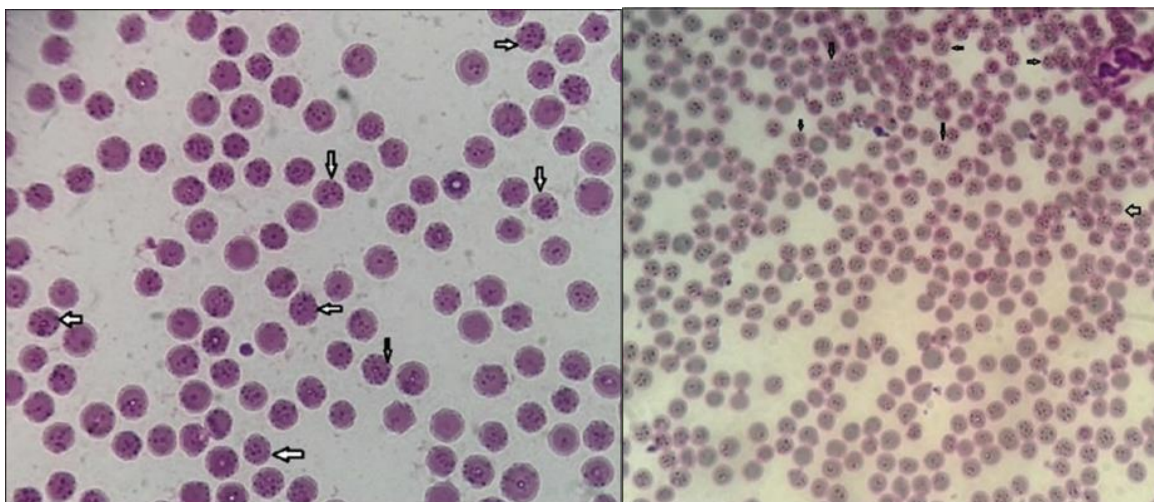


Figura 2: Lâmina de esfregaço sanguíneo bovino indicando (setas) estruturas basofílicas sugestivas de *Mycoplasma* spp. hemotrópico aderidos à superfície de eritrócitos bovinos. Fonte: Khudhair *et al.* (2022).

O estudo de *M. wenyonii* e ‘Cmh’ é relativamente recente. Devido à inviabilidade de cultivo celular, os mecanismos de infecção são pouco conhecidos (Giroto *et al.*, 2012; Khudhair *et al.*, 2022). Grande parte dos estudos trata da identificação e ocorrência das espécies em rebanhos de diferentes países. Da mesma forma, ainda há poucas informações a respeito da patogenia, assim como da importância sanitária e econômica (Souza e Ruegg, 2023). Esses hemoplasmas têm sido reportados em frequências muito variáveis, de 2,9 % a mais de 60 % de animais positivos, em grande parte, como patógenos de animais aparentemente saudáveis, o que sugere a ocorrência de infecções crônicas, de caráter subclínico e assintomático (Giroto *et al.*, 2012).

Um dos fatores que tem chamado a atenção, é a alta ocorrência de coinfeção com *A. marginale*, e a possibilidade de transmissão transplacentária (Andrade *et al.*, 2024). No Brasil, o primeiro relato de ‘Cmh’ foi realizado na região sul do país (Giroto *et al.*, 2012), com 60,97 % de amostras de sangue bovino positivas, oriundas de universo de 433 coletadas.

Quanto à transmissão, apesar do reconhecido papel dos artrópodes como vetores biológicos (Boularias *et al.*, 2020), os agentes da TPB podem ser transmitidos também por vetores mecânicos, como moscas e mosquitos (*A. marginale*), por via iatrogênica e via transplacentária, na transmissão vertical (Kocan *et al.*, 2010; Reinbold *et al.*, 2010; Aubry e Geale, 2011; Silvestre *et al.*, 2018; Gray *et al.* 2019). Segundo Giroto *et al.* (2012), mais

investigações seriam necessárias para que se pudesse afirmar as formas de transmissão de *M. wenyonii* e ‘Cmh’. Evidências mais recentes demonstram que o mesmo pode ser aplicado a essas espécies (Andrade, 2021; Khudhair *et al.*, 2022; Souza e Ruegg, 2023).

Os estudos que abordam transmissão vertical têm levantado o grande potencial da via transplacentária como forma de manter a circulação dos agentes, principalmente em rebanhos em que há redução considerável da população de vetores. Porém, recentes achados de espécies de *Anaplasma* em amostras de leite de ruminantes evidenciaram a necessidade de sua investigação como possível fonte de transmissão vertical. A presença de *A. marginale* (Dela Cruz *et al.*, 2019) em amostras de leite bovino, e *A. bovis*, *A. ovis* e *A. phagocytophilum* em amostras de leite caprino e ou ovino (Zhang *et al.*, 2016), foi reportada na última década, embora ainda não sejam encontradas publicações acerca da viabilidade dos agentes ou potencial de transmissão.

A variedade de estirpes de *A. marginale* encontradas entre regiões, propriedades e, por vezes, no mesmo hospedeiro é outro fator importante que passa a ser considerado na epidemiologia da doença, uma vez que a diversidade pode determinar diferentes mecanismos de evasão do sistema imune e comportamento da doença (Belkahia *et al.*, 2021). O agente, assim como *Babesia* spp. e micoplasmas hemotrópicos, é amplamente distribuído nas latitudes que permitem manutenção das populações de vetores biológicos e/ou mecânicos (**Tabela 1**). Mais recentemente, com o advento das biotecnologias de sequenciamento genético, novas sequências também têm sido relatadas para *M. wenyonii* e ‘C’mh, embora em menor frequência do que para *A. marginale* (Souza e Ruegg, 2023). Com isso, a prevalência desses hemopatógenos, identificação e caracterização de novas espécies e estirpes, constantemente, são alvo de estudos.

Tabela 1: Prevalência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Mycoplasma* spp. hemotrópico (*Mycoplasma wenyonii* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’) em rebanhos bovinos de diferentes regiões geográficas

Referência	Local	Agente	N amostral	Prevalência (%)	Isolados (N)
Ferreira <i>et al.</i> (2022)	América Latina	<i>A. marginale</i>	Meta-análise	48,9	-
Dhruba Das <i>et al.</i> (2022)	Índia	<i>A. marginale</i>	401	15,71	-
Kamani <i>et al.</i> (2022)	Nigéria	<i>A. marginale</i>	275	18,6	-
Fedorina <i>et al.</i> (2019)	Rússia	<i>A. marginale</i>	62	42	16
Jaimés-Dueñez <i>et al.</i> (2018)	Colômbia	<i>A. marginale</i>	1432	54,8	15
Mutshembele <i>et al.</i> (2014)	África do Sul	<i>A. marginale</i>	250	65-100	23
Palmer <i>et al.</i> (2004)	Kansas	<i>A. marginale</i>	261	29	11
Vieira <i>et al.</i> , 2019	Sul do Brasil	<i>B. bovis</i>	257	29	-

Amorim <i>et al.</i> , 2014	Nordeste do Brasil	<i>B. bovis</i>	309	20,4	-
Terkawi <i>et al.</i> , 2012	Síria	<i>B. bovis</i>	207	9,2	-
Awad <i>et al.</i> , 2011	Sudão	<i>B. bovis</i>	692	1,9	-
Ferreira <i>et al.</i> , 2022	América Latina	<i>Babesia</i> spp.	Meta-análise	62,6	-
Terkawi <i>et al.</i> , 2012	Síria	<i>B. bigemina</i>	207	15,5	-
Awad <i>et al.</i> , 2011	Sudão	<i>B. bigemina</i>	692	4	-
Vieira <i>et al.</i> , 2019	Sul do Brasil	<i>B. bigemina</i>	257	16	-
Amorim <i>et al.</i> , 2014	Nordeste do Brasil	<i>B. bigemina</i>	309	34	-
Ferreira <i>et al.</i> , 2022	América Latina	Coinfecção <i>Babesia</i> spp.	Meta-análise	8,2	-
Boularias <i>et al.</i> , 2020	Norte da Argélia	<i>Mycoplasma wenyonii</i> ou 'Candidatus' <i>Mycoplasma haemobos</i>	205	2,9	-

Tatsukawa <i>et al.</i> , 2020	Japão	<i>Mycoplasma wenyonii</i> ' <i>Candidatus</i> ' <i>Mycoplasma haemobos</i>	400	40,3 9,5	-
Niethammer <i>et al.</i> , 2018	Alemanha	<i>Mycoplasma wenyonii</i> ' <i>Candidatus</i> ' <i>Mycoplasma haemobos</i>	410	8,5 56,6	-

Os animais infectados por agentes da TPB podem desenvolver quadro agudo na primo-infecção, posteriormente, tornando-se portadores dos agentes, de modo a contribuir para manutenção desses no rebanho (Kocan *et al.*, 2010). Esses hemopatógenos parasitam os eritrócitos bovinos e se alojam no interior dessas células, de modo que *A. marginale* tem localização marginal, enquanto *Babesia* spp. assume posição central. Não obstante, durante o curso da infecção esses microrganismos podem se apresentar livres na circulação sanguínea.

A transmissão de TPB está muito ligada à presença dos vetores biológico e mecânico. No caso da transmissão biológica, a importância pode ser explicada pela participação do vetor como hospedeiro definitivo para os três agentes, como pode ser observado, de forma esquemática, nas **Figuras 3 e 4**.

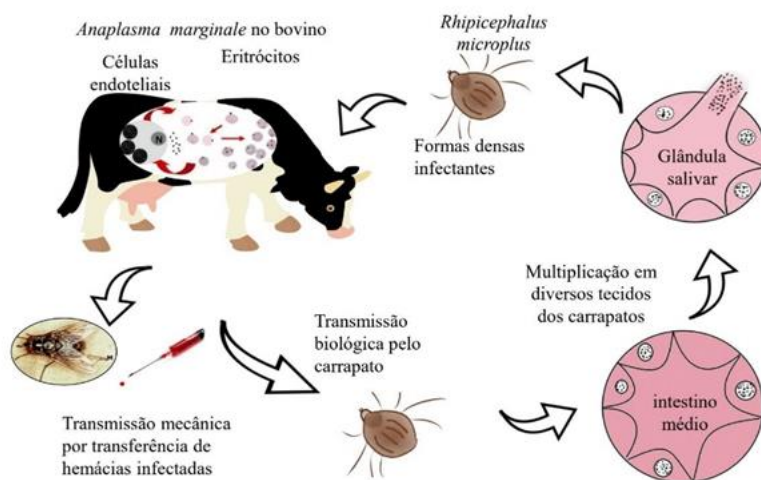


Figura 3: Resumo do ciclo biológico de *Anaplasma marginale* e exemplo de transmissão mecânica por compartilhamento de agulha com sangue contaminado. Criado por Isabela O. Melo. Fonte: Mendonça *et al.*, 2022.

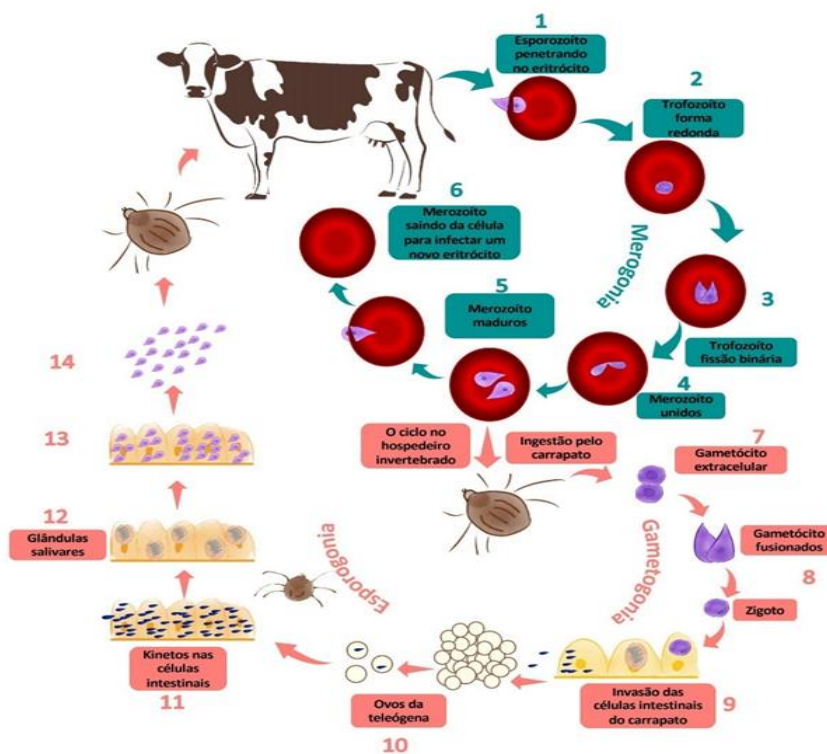


Figura 4: Resumo do ciclo biológico de *Babesia* spp. Criado por Isabela O. Melo. Fonte: Mendonça *et al.*, 2022.

Embora essencial para que ocorra o ciclo completo dos agentes, a presença do carrapato não é indispensável para transmissão dos mesmos, fato evidenciado pela possibilidade das demais vias de infecção, com destaque para o papel de moscas e mosquitos hematófagos para as hemobactérias. Por outro lado, a transmissão vertical pela via transplacentária tem sido cada vez mais reportada para *A. marginale*, com percentuais muito variáveis de bezerros nascidos positivos em testes moleculares, de 10 a 41,6 % (Meneses, 2013; Coelho, 2022), enquanto para *B. bovis* e *B. bigemina* são encontrados cerca de 0 a 6,66 % (Costa *et al.*, 2016; Coelho, 2022) e 0,8 a 3,33 % (Costa *et al.*, 2016; Coelho, 2022), respectivamente.

Apesar de que ainda não se tenha conhecimento sobre como isso pode afetar os animais, o fato de bezerros nascerem infectados leva a ponderar o papel dessa via na manutenção dos agentes no rebanho (Jasik *et al.*, 2015). Em geral, *B. bovis* e *B. bigemina* são menos relatadas na transmissão transplacentária que *A. marginale* (Costa *et al.*, 2016). Ao interpretar esses estudos, é preciso levar em consideração a prevalência dos agentes dentro de cada universo amostrado, bem como o perfil do sistema de criação e fatores associados à epidemiologia em cada cenário, o que poderia interferir na possibilidade de encontrar recém-nascidos positivos. Virulência, patogenicidade, diversidade genética, além da resposta imune do hospedeiro, fatores ambientais e diferenças de manejo também poderiam estar relacionados à capacidade de cada agente em ultrapassar as barreiras transplacentárias. Dessa forma, ainda é difícil precisar mecanismos centrais que possam estar envolvidos na maior ocorrência de transmissão transplacentária para *A. marginale* e *Mycoplasma* spp. hrmotrópicos.

Os sinais clínicos da TPB envolvem anorexia, apatia, perda de peso, palidez de mucosas, ressecamento de mucosas, queda do desempenho produtivo, aumento de frequência cardíaca e respiratória, hipertermia, e podem levar ao aumento do risco de outras infecções (Kocan *et al.*, 2010; Atif *et al.*, 2015). Muitos desses sinais associam-se aos quadros de anemia e desidratação que acabam por acometer os animais enfermos, podendo chegar ao óbito. Sintomas mais graves como icterícia e hemoglobinúria na anaplasnose podem ser observados em casos agudos e/ou mais avançados, geralmente, decorrentes de diagnóstico tardio (Mendonça *et al.*, 2022). Quando do diagnóstico, esses animais já se encontram mais debilitados e apresentam pior prognóstico e maior risco de mortalidade, enquanto animais diagnosticados precocemente têm a vantagem de apresentarem sinais clínicos brandos a moderados, com maior chance de recuperação (Mendonça *et al.*, 2022). Por outro lado, a babesiose aguda e severa pode levar ao desenvolvimento de sintomas neurológicos.

A prevenção ainda é baseada em controle de vetores, tratamento de quadros clínicos, manutenção de estabilidade enzoótica e inoculação de estirpes vivas atenuadas (Gasparini *et al.*, 2013). Assim, quanto mais cedo o bovino contrair a infecção, natural ou não, melhores são as chances de sucesso. Deve-se considerar que técnicas de imunização envolvendo inoculação de estirpes vivas atenuadas podem ser eficazes do ponto de vista imunológico (Mendonça, 2015), porém, podem representar alto risco de morbidade e mortalidade, além das dificuldades logísticas e operacionais (Palmer e McElwain, 1995; Salinas-Estrella *et al.*, 2022).

No cenário da intensificação dos sistemas e redução do contato entre os animais e os vetores, a transmissão via vertical surge como importante meio de manutenção, especialmente da anaplasmose, uma vez que é observada maior taxa de bezerros infectados no útero, além de já serem encontrados estudos a respeito de resistência de *A. marginale* às bases utilizadas em tratamentos (Shahbazi *et al.*, 2021). Por esses e outros motivos, nos últimos anos tem se falado cada vez mais em aprimorar medidas de controle e desenvolver programas de saúde voltados especificamente para TPB, a fim de reduzir perdas com morbidade, mortalidade e uso excessivo de medicamentos (Souza *et al.*, 2021; Mendonça *et al.*, 2022). Diante da indisponibilidade de vacinas de alta eficácia, a manutenção de áreas de estabilidade e contato com vetores para que ocorra desenvolvimento da resposta imune ainda é fundamental.

Souza *et al.* (2021) demonstraram vantagens econômicas e maior assertividade dos tratamentos de TPB, com redução do número de animais tratados quando da realização de monitoramento de animais em categoria de risco para a doença. Para este estudo, os alvos foram animais de recria de rebanho leiteiro, entre três e 14 meses de idade. O monitoramento semanal foi realizado por aferição da temperatura retal (TR) vs. aferição da temperatura retal mais confecção de lâmina de esfregaço sanguíneo dos animais com variação a partir de 0,5 °C em relação à última aferição, em um total de 395 animais. No primeiro caso, todos os animais com variação da TR foram tratados para anaplasmose e babesiose, enquanto no segundo, foram realizados tratamentos específicos quando da identificação dos agentes no esfregaço sanguíneo.

Em adição, Heller *et al.* (2022), avaliaram eficácia dos parâmetros TR, considerando hipertermia a partir de 39,3 °C; esfregaço sanguíneo e fração de volume de eritrócitos (ou hematócrito). Os autores relataram maior ganho de peso e menores riquetsemia, coinfeções e necessidade de intervenções drásticas quando o hematócrito foi utilizado como ferramenta para

monitorar anaplasiose, com sensibilidade de 74,2 % e especificidade de 97 %. O número de casos de babesiose não permitiu comparação estatística.

O aprimoramento e otimização do manejo de controle da TPB, sem reduzir as chances de diagnóstico precoce, foi alvo de estudo que considerou dados obtidos de equipamentos automatizados. Teixeira *et al.* (2022) utilizaram dados de ruminação e atividade coletados por sensores para presunção de diagnóstico de anaplasiose. Os animais foram desafiados com estirpe UFMG1 de *A. marginale* e acompanhados para verificação desses parâmetros. Ruminação e atividade reduziram 34 % e 11 %, respectivamente, nos animais doentes. A acurácia, sensibilidade e especificidade do parâmetro ruminação foram altas, acima de 83 %, sendo possível identificar 80 % dos animais cerca de três dias antes do surgimento dos primeiros sinais que permitiriam o diagnóstico clínico.

O uso de sensores pode ser útil ao realizar triagem, chamando a atenção do técnico ou colaborador para animais em risco dentro das categorias mais afetadas pela doença em cada propriedade, além de servirem a outros propósitos (Teixeira *et al.*, 2022). É crucial destacar que o uso de sensores não elimina a necessidade de avaliação clínica feita por médico veterinário, ou dos exames realizados por este e/ou colaboradores treinados nas propriedades.

A frequência de novas estirpes e sucessivos relatos de prevalência, diagnóstico de transmissão congênita e outros reforçam o caráter emergente e consistente dos hemopatógenos, que deixam clara a necessidade de continuação dos estudos e tomada de ações imediatas para contenção e controle desses agentes.

4.2. Transmissão vertical de patógenos

A transmissão vertical de patógenos é definida como a via de transmissão que permite a passagem do agente da mãe para o feto ou para a cria nascida, dessa forma, pode ocorrer durante a gestação, via transplacentária e durante a lactação (Jasik *et al.*, 2015). De acordo com a literatura, os primeiros relatos científicos de infecções congênitas em mamíferos parecem ter surgido por volta dos anos 1800, com casos de transmissão congênita de varicela em humanos (Laforet e Linch, 1947). A partir da metade dos anos 1900, tornaram-se mais frequentes e diversificados quanto aos agentes relatados (Laforet e Linch, 1947). Já na Medicina Veterinária, estudos de infecções congênitas de mamíferos aparecem concentrados nas últimas

décadas, com relatos de transmissão transplacentária para diferentes patógenos (Silvestre *et al.*, 2016; Atif *et al.*, 2020; Andrade *et al.*, 2024). Muito do conteúdo encontrado na literatura diz respeito ao vírus da diarreia bovina a vírus (BVD) (Brownlie *et al.*, 1998; Bielefeldt-Ohmann *et al.*, 2008; Gallina *et al.*, 2021) e *Neospora caninum* (Paré *et al.*, 1996; Fioretti *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2022).

Em revisão sobre a transmissão vertical de patógenos transmitidos por carrapatos, Jasik *et al.* (2015) destacaram a importância passível de ser atribuída à via transplacentária na epidemiologia dessas doenças e o fato de, ao contrário do que se espera, a placenta não ser uma barreira de absoluta eficácia quando se trata da proteção do feto contra patógenos. Para neosporose bovina, por exemplo, o papel da transmissão transplacentária já demonstrou o potencial desta via na disseminação do agente *N. caninum* entre gerações, mesmo na falta do hospedeiro definitivo (Shcares *et al.*, 1998).

A transmissão transplacentária de hemopatógenos transmitidos por carrapatos ganhou maior atenção nas últimas três a quatro décadas (Jasik *et al.*, 2015), e os relatos que demonstram a infecção congênita são cada vez mais constantes. No caso dos bovinos, *A. marginale* se destaca. Em estudo experimental, Swift e Paumer (1976) haviam demonstrado ser possível infecção do feto por *A. marginale* no terceiro trimestre de gestação em novilhas desafiadas. Mais tarde, outros estudos experimentais demonstraram ser possível que fêmeas gestantes infectadas no segundo ou terceiro trimestre contaminassem suas crias (Zaugg e Kuttler, 1984; Zaugg, 1985). Por outro lado, Andrade (2021) identificou fetos bovinos positivos no diagnóstico molecular para *A. marginale* também no primeiro trimestre de gestação em animais naturalmente infectados. Diversos estudos avaliaram a prevalência de transmissão vertical de *A. marginale* sob condições experimentais e/ou naturais (Ribeiro *et al.*, 1995; Meneses, 2013; Atif *et al.*, 2021), incluindo identificação de diferentes estirpes de *A. marginale*, potencial patogênico e variáveis regionais (Costa *et al.*, 2016).

No estudo de Atif *et al.* (2021) é interessante notar que os autores realizaram três coletas: sangue e soro de vacas gestantes (120 d), sangue e soro das vacas ao parto e sangue e soro de bezerros recém-nascidos não colostrados. Cinquenta e quatro gestantes foram positivas para *A. marginale* na primeira amostragem, e 38, ao parto. Foram amostrados os bezerros provenientes das vacas que continuaram positivas ao parto, tendo demonstrado 31 % de bezerros positivos, dos quais, 12 % em PCR e 28 % sorologia. A variedade de resultados

corroborar a variação que pode ocorrer no período de infecção intrauterina, bem como as diferentes respostas encontradas. Além disso, deve-se atentar para o fato de menos vacas terem sido positivas ao parto do que anteriormente, o que poderia estar associado aos perfis imunológicos nas diferentes fases de gestação e mecanismos patogênicos para sobrevivência do agente.

Diferentemente do que ocorre nos animais com doença clínica, a identificação do agente em animais recém-nascidos pelo exame parasitológico direto, assim como em animais de outras idades que não estejam com anaplasmose em curso apresenta baixa sensibilidade (Mendonça, 2015; Dhruba Das *et al.*, 2022). Bahia *et al.* (2020) encontraram diferença de cerca de 20 pontos percentuais na prevalência de bezerros positivos para *A. marginale* ao se realizar técnica molecular ou esfregaço sanguíneo (**Tabela 2**) em 300 animais, de 10 a 300 dias de idade, em três municípios de Minas Gerais. Em investigação epidemiológica de Costa *et al.* (2016), apenas três dos nove bezerros com infecção congênita diagnosticada por PCR apresentaram riquetsemia de *A. marginale* no esfregaço sanguíneo.

Tabela 2: Prevalência de *Anaplasma marginale* em bezerros de 10 a 300 dias de idade, em três municípios de Minas Gerais, diagnosticada por diferentes técnicas de avaliação

Município	Prevalência de <i>A. marginale</i> (%)	
	Técnica molecular	Esfregaço sanguíneo
A	42,53	28,86
B	66,26	43,97
C	55,66	36,33

Fonte: Adaptado de Bahia *et al.* (2020).

Os dados mostram reduzida capacidade de diagnóstico do exame parasitológico, mais indicado para situação prática em animais com sinais clínicos de anaplasmose, como mucosas pálidas, anorexia, apatia e hipertermia (Mendonça *et al.*, 2022). Para identificação de animais

portadores ou cronicamente infectados, a técnica molecular nPCR mostra-se muito mais eficaz. No caso de recém-nascidos nas primeiras 24 h após o nascimento, nPCR seria a técnica mais indicada para identificação de animais com *A. marginale* contraído por via congênita, uma vez que a depender do período e curso da infecção, é provável que não seja observada parasitemia. O mesmo pode ser aplicado aos demais hemopatógenos alvos desta revisão.

Costa *et al.* (2016) avaliaram a epidemiologia da TPB em 60 vacas $\frac{3}{4}$ a $\frac{1}{4}$ *Bos taurus taurus* x *Bos t. indicus*, oriundas de sistema leiteiro semi-intensivo, média de produção de 10,9 kg, Bahia, Brasil. As vacas tiveram amostras de sangue colhidas aos 120 dias de gestação para diagnóstico sorológico de *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*. Ao parto, amostras de sangue das mesmas vacas e de seus bezerros foram coletadas para diagnóstico parasitológico (esfregaço sanguíneo), sorológico e molecular (nPCR). Dos 60 bezerros, 34 foram amostrados antes da colostragem. Ao parto, 59, 58 e 52 vacas apresentaram sorologia positiva para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente, enquanto na nPCR foram 27, 42 e 21 vacas. A transmissão vertical ocorreu em 10, quatro e dois bezerros para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente.

A confirmação da transmissão congênita foi dada pelos autores para aqueles bezerros com nPCR positivo ou, dentre os bezerros não colostrados, para os que apresentaram sorologia positiva, indicando contato com o agente e resposta adaptativa durante a vida intrauterina (Costa *et al.*, 2016). Este trabalho demonstrou coinfeção por *A. marginale* e *B. bovis* em um bezerro, além do primeiro relato de coinfeção tripla, em apenas um animal. Três dos bezerros nascidos com *A. marginale* congênito chegaram a óbito nas primeiras horas após o nascimento. Os animais apresentavam sinais clínicos compatíveis com anaplasmose e um deles não obteve resultado positivo para pesquisa de outros agentes. Os autores destacam o fato de que parte dos óbitos nas primeiras horas de vida pode ser oriunda de casos de anaplasmose congênita e estejam sendo subestimadas devido à falta de diagnóstico (Costa *et al.*, 2016).

Para Jasik *et al.* (2015), a supressão imunológica durante a gestação, possíveis danos estruturais à placenta, tipo de placentação, passagem de macrófagos e estado assintomático ou de cronicidade foram considerados possíveis fatores de transmissão relacionados à mãe, enquanto baixa virulência, baixa patogenicidade, capacidade de disseminação, capacidade de sobrevivência e caráter intracelular seriam possíveis fatores de transmissão associados aos patógenos. Quanto aos danos estruturais da placenta, Liu *et al.* (2022) demonstram potencial

dano vascular e epitelial nas estruturas da placenta como possível porta de entrada para *Salmonella* sp. Nessa condição, tanto as infecções individuais quanto as coinfeções de hemopatógenos poderiam ganhar importância a mais na epidemiologia das doenças.

Ademais, o tropismo que alguns microrganismos podem apresentar por determinadas estruturas (**Figura 5**), como no caso da *Brucella abortus* por tecidos uterinos e glândula mamária (Czibener e Ugalde, 2012) também deve ser considerado.

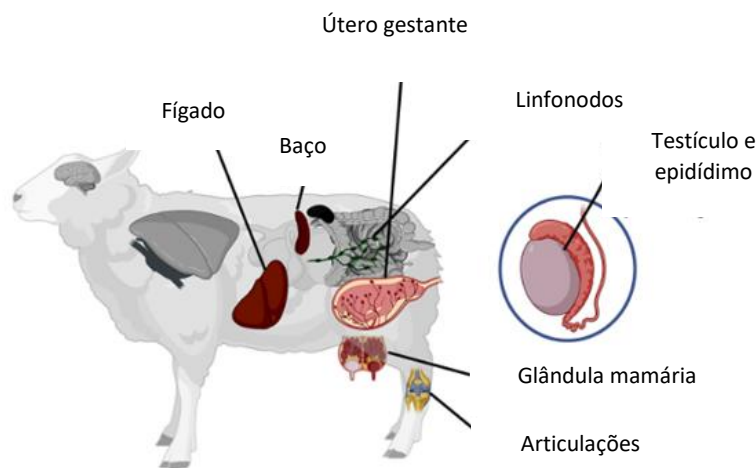


Figura 5: Órgãos apontados como tecido alvo de importância para *Brucella* spp. em ruminantes. Fonte: Adaptado de Carvalho *et al.* (2023).

Embora os estudos em imunologia bovina tenham avançado nas últimas décadas e demonstrado diferentes perfis de imunossupressão e imunoestimulação durante a gestação (Vlasova e Saif, 2021), a complexidade das respostas encontradas, bem como a delicada relação materno-fetal ainda não permitiu elucidação dos mecanismos de infecções verticais. Segundo revisão de Jasik *et al.* (2015), a modulação da resposta imune induzida pela própria infecção permitiria aumento do risco de contaminação, pela criação de ambiente que contribuiria para a sobrevivência e disseminação do agente.

Em geral, as amostras de sangue e tecidos para diagnóstico de infecções congênitas e estudos sorológicos de crias que vêm a termo são prioritariamente colhidas dos neonatos logo após o nascimento e antes da ingestão do colostro, com o objetivo de não sofrer o viés da presença de anticorpos colostrais. A necessidade desse cuidado de amostragem é comprovada por relatos de amostras de colostro contaminadas por agentes como *M. bovis*, vírus da leucose bovina e *Salmonella* (Houser *et al.*, 2008; Gille *et al.*, 2020; Úsuga-Monroy *et al.*, 2021), que realçam também a preocupação em relação à transmissão de patógenos via colostro. O colostro, assim como o leite bovino, é um veículo para microrganismos patogênicos e não patogênicos. Em sua revisão sobre imunologia bovina, Vlasova e Saif (2021) deixam clara a importância e presença do rico microbioma do colostro, além de seu papel fundamental para o neonato no que tange a funções vitais, homeostase e desenvolvimento da microbiota e imunidade.

Quanto a outras infecções relatadas para a via transplacentária, Hanson *et al.* (2016) investigaram a presença de bactérias do gênero *Salmonella* em 20 bezerros neonatos. Amostras de linfonodo subilíaco, pré-escapular e mesentérico, bem como de baço, fígado, intestino delgado, ceco, cólon e reto foram coletadas assepticamente, após eutanásia dos bezerros, dois minutos após o nascimento. Amostras de fezes foram coletadas de 19 mães e dos 20 bezerros. Foi recuperada *Salmonella* sp. em 94,7 % das amostras de fezes de mães e em 12,7 % de para os bezerros. Nos tecidos, *Salmonella* sp. foi isolada em 50 % dos neonatos, em diferentes proporções e distribuição, em que se destacaram os linfonodos (20 % dos bezerros), baço e fígado (15 % dos bezerros), chegando a 30 % dos bezerros em tecidos da porção gastrointestinal. Os achados demonstraram a transmissão congênita de *Salmonella* e capacidade de disseminação do agente no ambiente pelo organismo infectado por essa via, uma vez que logo após o nascimento já foi possível detectar o agente em diferentes tecidos. Destaca-se o fato de que os bezerros eram aparentemente saudáveis, assim como suas mães. A transmissão deste agente pela via congênita já havia sido reportada em fetos que não vieram a termo. Dez sorotipos foram identificados nesse estudo (**Tabela 3**).

Tabela 3: Sorotipos de *Salmonella* isolados de amostras de tecido de bezerros neonatos e fezes de bezerros e suas mães

Sorotipo	Bezerros		Mães	
	n	%	n	%
Anatum var. 15+	12	14,3	3	5,4
Cerro	1	1,2	0	0
Kentucky	3	3,6	0	0
Mbandaka	0	0	6	10,7
Meleagridis	19	22,6	5	8,9
Montevideo	28	33,3	23	41,1
Muenchen	21	25	6	10,7
Newport	0	0	11	19,6
Senftenberg	0	0	1	1,8
Typhimurium	0	0	1	1,8
Total de isolados	84	100	56	100
Total de sorotipos identificados	6		8	

Fonte: Adaptado de Hanson *et al.*, (2016). Material suplementar 2, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268815002241>.

O nascimento de bezerros aparentemente saudáveis e infectados por *Salmonella* pode representar um alerta. Assim como nos casos de BVD congênita, é possível que a *Salmonella* seja dotada de mecanismos de evasão imunológica e escape ao reconhecimento pelo feto bovino, o que não pôde ser avaliado no estudo de Hanson *et al.* (2016). De qualquer modo, essas são apenas explanações, sendo necessária investigação que leve à elucidação desses mecanismos, bem como período de infecção e resposta imune fetal.

Kelling e Topliff (2013), em revisão a respeito da relação imunológica materno-fetal na transmissão congênita de BVD não citopática reforçam que a suscetibilidade animal é dependente de diversos fatores, como os relacionados à idade gestacional, fatores individuais e características biológicas da estirpe viral. No caso do feto, os principais fatores estão associados à idade e estágio de desenvolvimento do sistema imune. A depender desses fatores, o destino das crias pode variar desde o desenvolvimento embrionário a defeitos congênitos, morte fetal e aborto, bem como desenvolvimento de imunotolerância e estabelecimento de infecções persistentes (Kelling e Topliff, 2013).

Dessa forma, os bezerros infectados no terceiro trimestre apresentam anticorpos não colostrais à estirpe não citopática, enquanto a infecção placentária e fetal por BVD no primeiro ou segundo trimestres de gestação induz uma série de fatores de imunossupressão, ligados à alta ou baixa regulação da expressão de genes, principalmente pelas células do sistema linfocitário (Kelling e Topliff, 2013). Nas fêmeas que apresentam infecção aguda no início da gestação, tendo como resultado o desenvolvimento de fetos persistentemente infectados é possível detecção de altos níveis de anticorpos específicos nos últimos dois meses de gestação (Lindberg *et al.*, 2001). Esse é um parâmetro muito utilizado para identificação de fetos persistentemente infectados. Antes do terço final de gestação a avaliação sorológica não apresenta boa sensibilidade, e pode gerar resultados confusos devido à influência do histórico de vacinação e exposição dos animais (Stokstade *et al.*, 2003).

Nesse sentido, em estudo do presente grupo de pesquisa, Andrade (2021) avaliou 236 fetos bovinos provenientes de abatedouro (Minas Gerais, Brasil) quanto ao diagnóstico molecular de *Babesia* spp., *Theileria* spp., *N. caninum*, *Trypanosoma vivax*, *A. marginale*, *A. bovis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia minasensis* e 'Cmh', além de diagnóstico sorológico para *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina* e *T. vivax*. Neste estudo, foi reportada alta prevalência de transmissão transplacentária, tanto em mono como em coinfeções, com 70 %

dos fetos positivos para pelo menos um dos agentes, destacando-se ocorrência de *N. caninum* (49,6 %), 'Cmh' (42,75 %), *A. marginale* (19,31 %) e *B. bigemina* (6,2 %). Os demais agentes pesquisados não foram encontrados. Esse estudo foi um dos pilares que motivou o presente trabalho.

Uma vez que a capacidade de fornecimento de nutrientes e componentes ao feto é aumentada com o avanço da gestação pela expansão das áreas de trocas materno-fetais e maior permeabilidade da barreira placentária, a fim de facilitar trocas e passagem de substratos metabólicos (Limesand *et al.*, 2018), fatores que alterem essas características poderiam influenciar a probabilidade de infecções congênitas. Os mecanismos de transporte de nutrientes e metabólitos incluem transporte ativo, difusão passiva e difusão facilitada, sendo essas últimas determinadas, principalmente, pelo fluxo sanguíneo local, além de características físico-químicas do alvo a ser transportado. No caso da redução do tamanho da placenta e das conexões materno-fetais, o fluxo sanguíneo aumentado é um dos mecanismos utilizados pelo organismo para tentar suprir o déficit de transporte (Limesand *et al.*, 2018).

Outros efeitos importantes relacionam-se a alterações no próprio consumo de nutrientes e substratos pelo tecido uteroplacentário, alteração na conformação de receptores de superfície de membranas celulares e a resposta do feto à deficiência gerada por essas alterações (**Figura 6**) (Limesand *et al.*, 2018). Os gráficos demonstram aumento da concentração de cortisol fetal em fetos expostos a condições de estresse térmico intrauterino. O cortisol, por sua vez, é um hormônio esteroide com múltiplas funções orgânicas. Quando aumentado na circulação sanguínea, pode causar efeito imunossupressor, reduzindo a ativação e funcionalidade de células fagocíticas. Em contrapartida, IGF-I é um importante modulador de crescimento e desenvolvimento tecidual, de modo que seu declínio poderia afetar o potencial funcional de órgãos e células fetais, inclusive aqueles relacionados ao sistema imune.

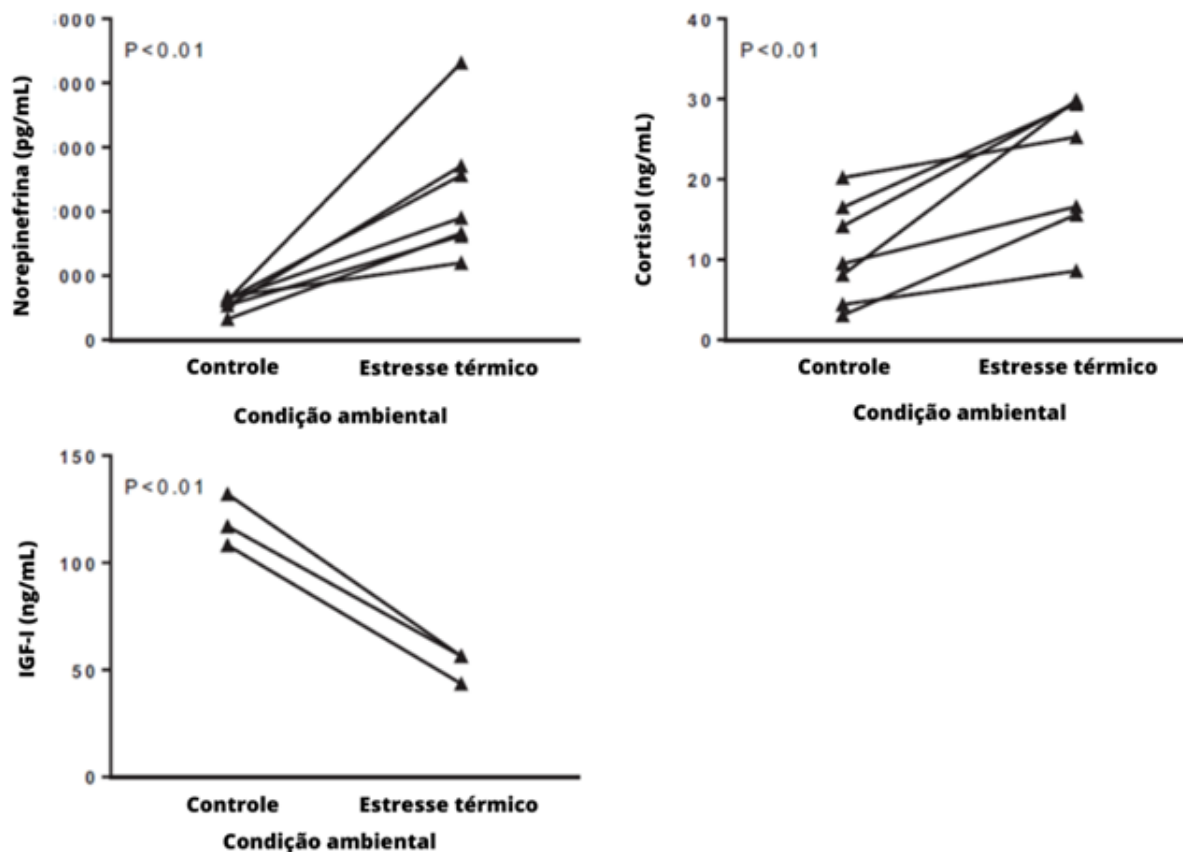


Figura 6: Perfil de produção de norepinefrina, cortisol e IGF-I em fetos expostos a estresse térmico induzido experimentalmente em ovelhas. Fonte: Limesand *et al.* (2018).

Em estudos anteriores, Limesand *et al.* (2007) relataram produção endógena de glicose pelo feto, que, associada a outras vias, seria responsável por importantes alterações hepáticas, musculares e endócrinas. Se as alterações ocorridas em decorrência de ambiência e manejo, por exemplo, são capazes de afetar a morfologia e funcionalidade de micro e macroestruturas placentárias, é possível que permitam maior ou menor segurança em relação a essas infecções. Ao analisar a literatura acerca desse tema, alguns fatores se destacam quando pensamos em transmissão de *A. marginale* e características regionais de zonas endêmicas.

Faz-se importante o estudo mais detalhado dos processos imunes materno-fetais. A elucidação de vias e mecanismos de infecção é fundamental para que sejam estudadas medidas de controle em momentos chave da gestação. Considerando os relatos de transmissão vertical de doenças transmitidas por carrapatos em bovinos, como a anaplasmose, babesiose e

hemoplasmose, o papel dessa via torna-se de interesse no sentido de estimular a condução de estudos que permitam melhor compreensão de seus mecanismos e efeitos. Diante da crescente intensificação dos sistemas de criação, na direção do avanço dos avanços mundiais em criação animal.

Ao passo que a via transplacentária é reconhecidamente uma rota importante para manutenção de muitos patógenos, a presença de patógenos via secreção láctea como via de transmissão vertical parece ser, de certa forma, negligenciada na criação de bovinos. O leite de ruminantes é reportado como meio de veiculação de patógenos por dados bem fundamentados no que diz respeito a microrganismos causadores de mastite. Bactérias e outros agentes eliminados por essa via constituem importante forma de manutenção desses agentes e de casos de mastite nos rebanhos (McDougall *et al.*, 2009; De Vliegher *et al.*, 2012), contaminando animais jovens e adultos, além de serem responsáveis por outras doenças, como no caso de *M. bovis* (Maunsell *et al.*, 2011).

Dentre os agentes mais relatados estão as principais bactérias associadas aos casos de mastite bovina, como *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus* (Harmon, 1995) e estafilococos não aureus (De Vliegher *et al.*, 2012; Zigo *et al.*, 2022). Além desses, foram relatados *Listeria monocytogenes* (Jensen *et al.*, 1996), *Mycobacterium bovis* (Leite *et al.*, 2003), vírus da diarreia viral bovina (Drew *et al.*, 1999) e vírus da leucose bovina (Kuckleburg *et al.*, 2003), *N. caninum* (Moskwa *et al.*, 2007), dentre outros.

Nos últimos anos, foram publicados os dois primeiros estudos que relataram evidência de DNA de microrganismos do gênero *Anaplasma* em amostras de leite frescas oriundas de ruminantes domésticos infectados naturalmente. No primeiro, 89 amostras de leite cabra e 31 de leite de ovelha foram analisadas por meio de PCR, tendo sido evidenciada presença de *A. ovis*, *A. bovis* e *A. phagocytophilum* em 12,5 % do total de amostras (Zhang *et al.*, 2016). Desses, apenas *A. ovis*, assim como *A. marginale*, é reportado como parasito de eritrócitos. Porém, isso não tira o mérito dos demais achados no sentido de alertar sobre os mecanismos de infecção e a possível versatilidade das espécies de *Anaplasma*. Em contrapartida, no segundo estudo, Dela Cruz *et al.* (2019) reportaram detecção de *Anaplasma*, com posterior caracterização filogenética, que revelou presença de *A. marginale*, destacando-se a alta similaridade entre as amostras de sangue e de leite (98-100 %). Contudo, os autores relataram

uso de gene genérico e sugeriram pesquisa de outras proteínas, como MSP1a para ampliação e maiores esclarecimentos em estudos futuros.

Por outro lado, Bezerra *et al.* (2023) reportaram diagnóstico molecular de *T. vivax* em colostro de cabras infectadas experimentalmente no último trimestre de gestação. Seis animais do grupo inoculado apresentaram sinais clínicos e parasitemia a partir dos primeiros dias de inoculação e permaneceram positivos em exame direto durante o período experimental. Nenhum cabrito teve diagnóstico positivo dentro dos primeiros 30 dias após o nascimento, porém, as amostras de colostro foram positivas entre 12 e 24 h após o parto.

Com isso em mente, a passagem de patógenos da circulação sanguínea para o colostro e ou leite poderia ser facilitada durante a colostrogênese e ou casos de mastite, devido ao aumento da permeabilidade vascular, bem como ruptura de barreiras de integridade por agentes pró-inflamatórios e mecanismos de transporte de moléculas (Janeway e Medzhitov, 2002; Vlasova e Saif, 2021). Embora os estudos tenham sido publicados em 2016 e 2019, ainda hoje não se encontra literatura relacionada à pesquisa de *A. marginale*, *Babesia* sp. e hemoplasmas de importância econômica em colostro, bem como investigação da viabilidade e transmissão dos agentes já relatados para leite. Na verdade, ainda são poucos os estudos relacionados à pesquisa molecular de patógenos em geral em amostras de colostro bovino (Gille *et al.*, 2020; Úsuga-Monroy *et al.*, 2021).

A mastite é um dos principais problemas relacionados à saúde em rebanhos leiteiros (Harmon, 1995). Com o crescimento da preocupação com a saúde dos bezerros, estudos sobre rotas de transmissão de doenças infectocontagiosas nos rebanhos se intensificaram. Uma vez levantada a hipótese de que as vacas com mastite por determinados agentes infecciosos poderiam trazer essa contaminação do úbere de outras fases da vida, grande atenção foi dada aos patógenos causadores de mastite e a possibilidade de contrair esses agentes durante o desenvolvimento da bezerra.

Com o objetivo de testar essa hipótese e demonstrar o ciclo e as vias de transmissão de alguns desses agentes, por um tempo, estudos se concentraram em investigar a transmissão de patógenos através do leite bovino. Sabemos que, ainda hoje, o uso do leite de descarte como fonte de alimentação para bezerros em propriedades leiteiras é muito frequente (Diniz *et al.*, 2018; Azevedo *et al.*, 2022). Nesses casos, o risco de disseminação de doenças infecciosas chama ainda mais a atenção, uma vez que é usado leite de animais sabidamente doentes, sendo

muitos deles, por casos de mastite, onde se terá grande chance de presença de agentes na secreção láctea.

Apesar de todo o conhecimento acumulado nesse sentido, poucos foram os estudos que avaliaram a presença de patógenos no colostro. Uma vez reconhecido por suas múltiplas funções e indispensabilidade (Godden, 2008; Lombard *et al.*, 2020), sendo incluído como manejo indispensável nos cuidados com os bezerros recém-nascidos, conhecer a qualidade do colostro é essencial. Quando falamos nessa qualidade, é natural pensarmos em concentração de imunoglobulinas, no entanto, o colostro é rico em diversos elementos celulares, citocinas, hormônios, nutrientes, fatores de crescimento, fatores antimicrobianos, e, microrganismos. No que tange à qualidade microbiológica, estudos mais recentes demonstram riqueza de espécies na constituição do microbioma do colostro, trazendo-o, inclusive, como fundamental para início da colonização microbiana do trato gastrointestinal dos bezerros (Chen *et al.*, 2021).

Em estudo vertical realizado na China, Zhang *et al.* (2016) reportaram pela primeira vez a identificação de *Anaplasma* sp. em amostras de leite de caprinos e ovinos sob condições naturais. O estudo obteve 414 amostras de sangue e 120 de leite de animais aparentemente saudáveis de 14 fazendas. O DNA de *A. phagocytophilum*, *A. bovis* e *A. ovis* foi identificado em duas, duas e 12 amostras, respectivamente, por nPCR, correspondentes a 12,5 % das amostras. Na pesquisa molecular em amostras de sangue total, 36,5 % foram positivas para um ou mais desses agentes. Considerando-se que *A. phagocytophilum* e *A. bovis* infectem células linfocíticas, e neutrófilos e monócitos, respectivamente, sua importância para a presente revisão é o fato de os achados corroborarem a passagem de células infectadas da circulação para a glândula mamária, juntamente com *A. ovis*, que parasita eritrócitos de pequenos ruminantes.

O estudo de Zhang *et al.* (2016) também realizou sequenciamento para identificação das estirpes. Em 12 das amostras de leite positivas para *A. ovis* foi encontrada a mesma sequência na amostra de sangue correspondente, assim como Dela Cruz *et al.* (2019) para *A. marginale* em amostras de leite bovino. Interessantemente, duas amostras de leite positivas para *A. ovis* no estudo de Zhang *et al.* (2016) foram oriundas de animais com resultado negativo para este agente na análise sanguínea, fato que os autores não puderam explicar. Contudo, sugeriram que *A. ovis* poderia ter provocado a lise do eritrócito, estando presente na forma livre no leite.

Embora sejam poucos os trabalhos que realizaram esse tipo de investigação, bactérias e vírus já foram identificados em amostras de colostro em diferentes países. O desenho experimental dos trabalhos variou, de modo que alguns realizaram levantamento epidemiológico regional, enquanto outros partiram da ocorrência de surtos/casos previamente relatados, a fim de direcionar suas buscas.

Assim como Zhang *et al.* (2016) e Dela Cruz *et al.* (2019), nos estudos relatados a seguir a detecção dos agentes foi realizada por meio de extração de DNA, com variação de protocolos entre os estudos, a depender da disponibilidade de materiais, e amplificação do DNA extraído por técnicas de diagnóstico molecular. Somado às eventuais limitações relativas ao agente, ambiente e ao indivíduo, os métodos diagnósticos são escassos, adaptados e, em alguns casos, de desconhecida confiabilidade, uma vez que nem todos os estudos relatam avaliações de controle interno de qualidade das amostras de DNA.

Mycoplasma bovis

Gille *et al.* (2020) relataram presença de DNA de *M. bovis* em amostras de colostro bovino provenientes de diferentes rebanhos, sabidamente afetados por micoplasmose. A ocorrência da doença se deu de formas variadas dentro dos rebanhos, com locais onde apenas animais adultos foram acometidos, enquanto em outros jovens e adultos desenvolveram doença. Os autores relatam prevalência geral de amostras positivas nos rebanhos de 3,2 %, no entanto, dos 17 rebanhos avaliados, esses somam apenas quatro, e correspondem a 1,9 % do total de amostras coletadas (7/368).

Embora o DNA tenha sido recuperado, não foram feitas análises de viabilidade do agente e potencial infectocontagioso por essa via (Gille *et al.*, 2020). Há ainda que se considerar a possibilidade de contaminação, uma vez que as coletas foram realizadas pelos próprios produtores, não permitindo a garantia de padronização dos protocolos de antissepsia para coleta. Dentre as propriedades com animais positivos, duas eram mistas, animais para leite e corte, enquanto as outras duas tinham animais com apenas uma das aptidões. Nas propriedades mistas, e de animais apenas de corte a prevalência de animais positivos nas amostras aleatórias foi maior, em termos percentuais (**Tabela 4**).

Tabela 4: Prevalência de amostras de colostro positivas para *Mycoplasma bovis* em propriedades mistas, apenas de corte, e apenas de leite

Propriedade	Total do rebanho (N)	Animais amostrados	Amostras positivas	Prevalência (%)
Mista	216	10	3	30,0
Mista	433	9	1	11,1
Corte	152	10	1	10,0
Leite	363	71	2	2,8

Fonte: Adaptado de Gille *et al.* (2020).

Salmonella

Houser *et al.* (2008) identificaram *Salmonella* e coliformes por PCR em amostras de colostro oriundas de 55 rebanhos na Pensilvânia (15 %; 8/55). O estudo também analisou cultura microbiológica, em que foram relatadas 323,4 UFC/mL para coliformes após processo de pasteurização. Já para *Salmonella*, os autores não especificaram crescimento na análise microbiológica ou protocolo de higienização para coleta, além de não ter sido feito sequenciamento para identificação de sorovares. Dado que *Salmonella* é habitante do trato gastrointestinal de bovinos saudáveis (Hanson *et al.*, 2016), e considerando que houve crescimento de coliformes mesmo após a pasteurização das amostras, é possível que tenha havido contaminação. Ainda assim, o estudo serve de alerta para potenciais riscos a bezerros e humanos. De fato, têm sido relatados surtos de salmonelose em bezerros (Mohler *et al.*, 2009; Muktara *et al.*, 2015). Os principais fatores de risco passam por higiene de instalações, manejo

de maternidade, manejo de cura de umbigo e de colostragem. Dessa forma, o colostro deve ser um ponto de atenção ao delinear estratégias de controle em rebanhos suscetíveis.

Vírus da leucose bovina

Úsuga-Monroy *et al.* (2021) fizeram o primeiro relato de transmissão comprovada do vírus da leucose bovina via colostro em rebanho da Colômbia. O estudo foi descritivo e identificou amostras de colostro positivas para o vírus em seis das sete vacas avaliadas. Cinco vacas apresentaram PCR do sangue positivo e três vacas tiveram PCR positivo no colostro. Na sorologia, seis das sete vacas apresentou anticorpos. Todos os bezerros nasceram negativos (PCR e sorologia). Aos 15 dias de idade, no entanto, os filhos de mães com sorologia positiva apresentavam anticorpos. Apesar disso, três desses bezerros tiveram PCR positivo nas coletas subsequentes, entre 15 e 30 dias de idade, demonstrando o potencial de contágio do colostro, e talvez do leite bovino. As amostras do leite fornecido até os 45 dias de idade foram analisadas e apresentaram sorologia positiva em todas as análises.

Os reagentes utilizados nessas técnicas são conhecidos e padronizados para extração de outros tipos de amostra biológica, tecidual, sanguínea e secreções. Da mesma forma, os protocolos de aplicação e uso desses reagentes foram adaptados, de acordo com experiências prévias e estudos com amostras de leite. Um passo comum a todos os protocolos consultados foi a clarificação das amostras de colostro, ou seja, centrifugação em alta rotação, por tempo variável, a fim de separar a fração de gordura e melhorar a qualidade da amostra e a sensibilidade e especificidade dos testes. Ainda que constitua objetivo em comum, os protocolos de clarificação variam entre os trabalhos, não havendo consenso. Para estudos em leite, nem todos realizaram esta etapa.

Outra limitação do uso estrito do diagnóstico molecular é a impossibilidade de confirmação da viabilidade do agente e capacidade de infectar outros animais (Dela Cruz *et al.*, 2019; Gille *et al.*, 2020). Para que isso possa ser investigado seriam necessários outros tipos de análise. Diante das limitações de financiamento para condução de estudos científicos e considerando uma linha lógica de acontecimentos, a confirmação do DNA seria o primeiro passo para justificar estudos mais elaborados com o intuito de investigar o colostro como potencial via de transmissão dos patógenos encontrados.

4.3. Coloostro e colostrogênese

O termo colostro, reportado pela primeira vez no século XVI, é o nome dado à primeira secreção produzida pela glândula mamária ao início de uma lactação (Neville *et al.*, 2002; Baumrucker e Bruckmaier, 2014). Este tecido apresenta particularidades entre as espécies e é conhecido por sua capacidade de diferenciação e desenvolvimento estimulados por alterações endócrinas em diferentes fases da vida, a saber: gestação, lactação e período de involução. Mais especificamente em relação ao colostro, a composição e mecanismos de formação diferem para se chegar ao produto adequado às necessidades da(s) cria(s), além de tornar a composição do colostro distinta em relação ao leite dentro da própria espécie (Neville *et al.*, 2002; Baumrucker *et al.*, 2021). Em bovinos, ao redor da 4^a semana que antecede o parto tem início a colostrogênese (Baumrucker e Bruckmaier, 2014), processo composto por mecanismos celulares e de transporte que resultam em sua produção.

A **figura 7** representa os mecanismos pelos quais moléculas e elementos das secreções lácteas são sintetizados ou carreados ao lúmen da glândula mamária (Baumrucker e Bruckmaier, 2014). No que diz respeito à possível entrada de patógenos intracelulares, destacam-se as vias 5 e 6 representadas no esquema, que permitem a passagem de células inteiras do sistema de defesa, como linfócitos, neutrófilos e macrófagos.

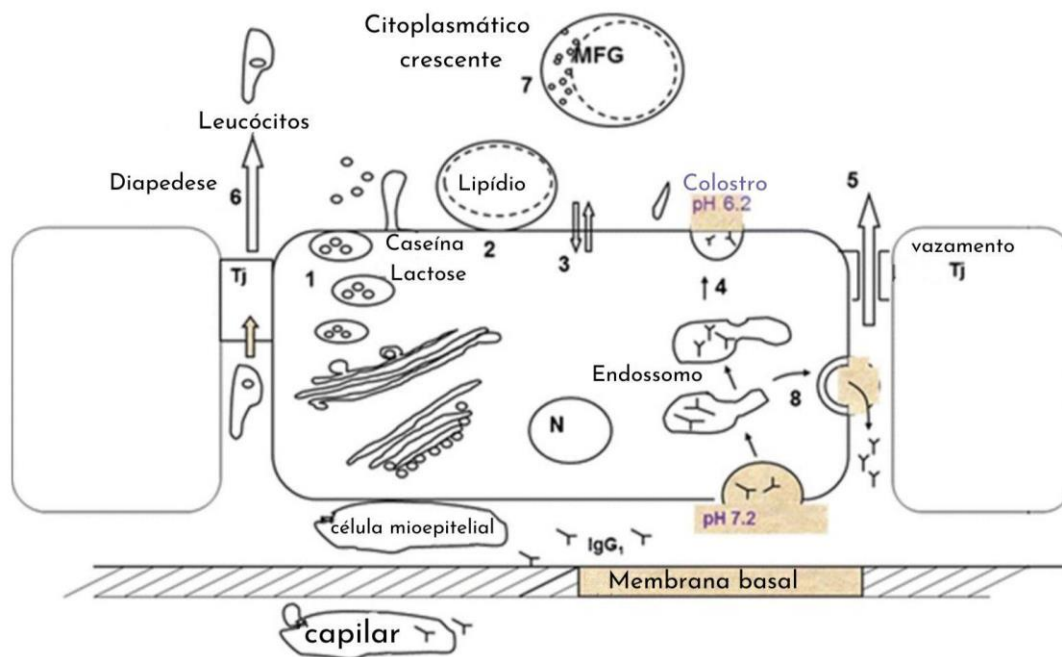


Figura 7: Mecanismos de síntese e passagem de moléculas e outros elementos para produção de secreção de leite e colostro em bovinos. Fonte: Baumrucker e Bruckmaier (2014).

Para tanto, a manutenção da saúde da glândula é dos pilares para produção adequada das secreções lácteas (Alnakip *et al.* 2014). Além de no colostro, linhagens de células linfocíticas, ou células somáticas, estão presentes no leite de vacas saudas. Em contrapartida, durante a mastite há grande influxo dessas células para o epitélio mamário e o lúmen glandular (Harmon, 1995; Wellnitz *et al.*, 2015). Mecanismos de transporte de células e outros componentes para o leite e colostro, como a diapedese e maior permeabilidade vascular, podem ser observados durante as respostas inflamatórias, estimulados pela produção de citocinas e outros elementos pró-inflamatórios. Dessa forma, a colostrogênese, lactação e casos de mastite teriam fatores em comum favoráveis à passagem de patógenos via barreira epitelial mamária. A **figura 8** demonstra a passagem por diapedese de neutrófilos da circulação sistêmica pelo epitélio secretor em glândula mamária aparentemente sadia.

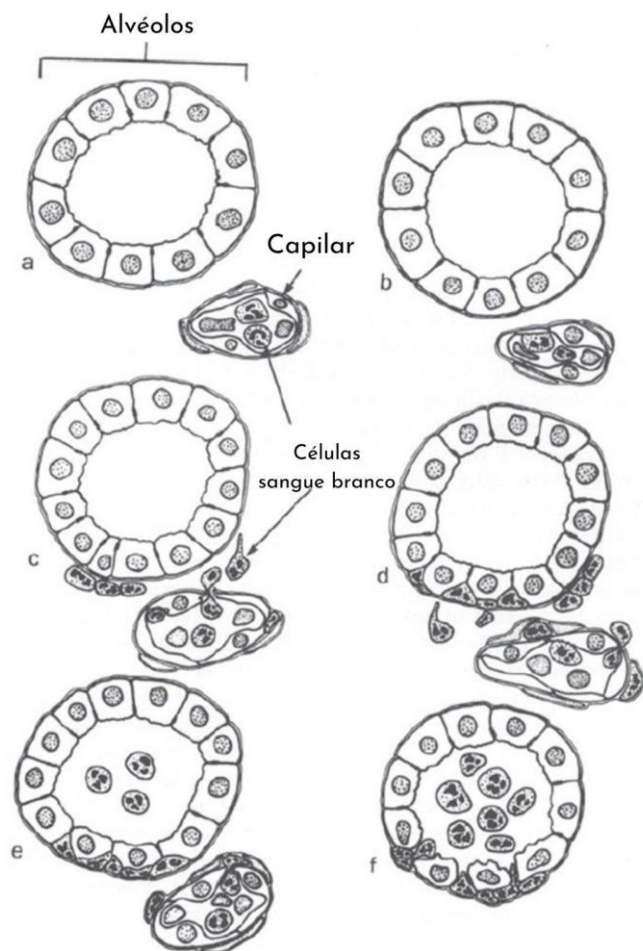


Figura 8: Invasão do epitélio alveolar mamário bovino por polimorfonucleares do sistema linfocítico. Fonte: Harmon (1995).

Todavia, a ocorrência de inflamação, seja de origem infecciosa ou não, pode levar a alterações estruturais do epitélio mamário (**Figura 9**). Por sua vez, a invasão e resposta à injúria no tecido mamário provocam liberação de diversos mediadores químicos imunológicos (histamina, prostaglandinas, leucotrienos, fator de necrose tumoral, quininas, citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio) que ativam receptores na superfície das células locais e endoteliais, a fim de facilitar o recrutamento e passagem de polimorfonucleares e outras linhagens linfocíticas ao local da agressão tecidual (Wellnitz *et al.*, 2015; Vlasova e Saif, 2021). No local de ação, os mediadores e as células recrutadas/ativadas atuam contra possíveis invasores, mas também contra constituintes do leite, como a gordura, e até ao próprio tecido. Dessa forma, a resposta inflamatória, principalmente se for exacerbada, pode causar danos importantes à integridade do epitélio e do endotélio circundantes, o que favoreceria ainda mais

a entrada de outros elementos da circulação sanguínea, incluindo células infectadas por patógenos intracelulares.

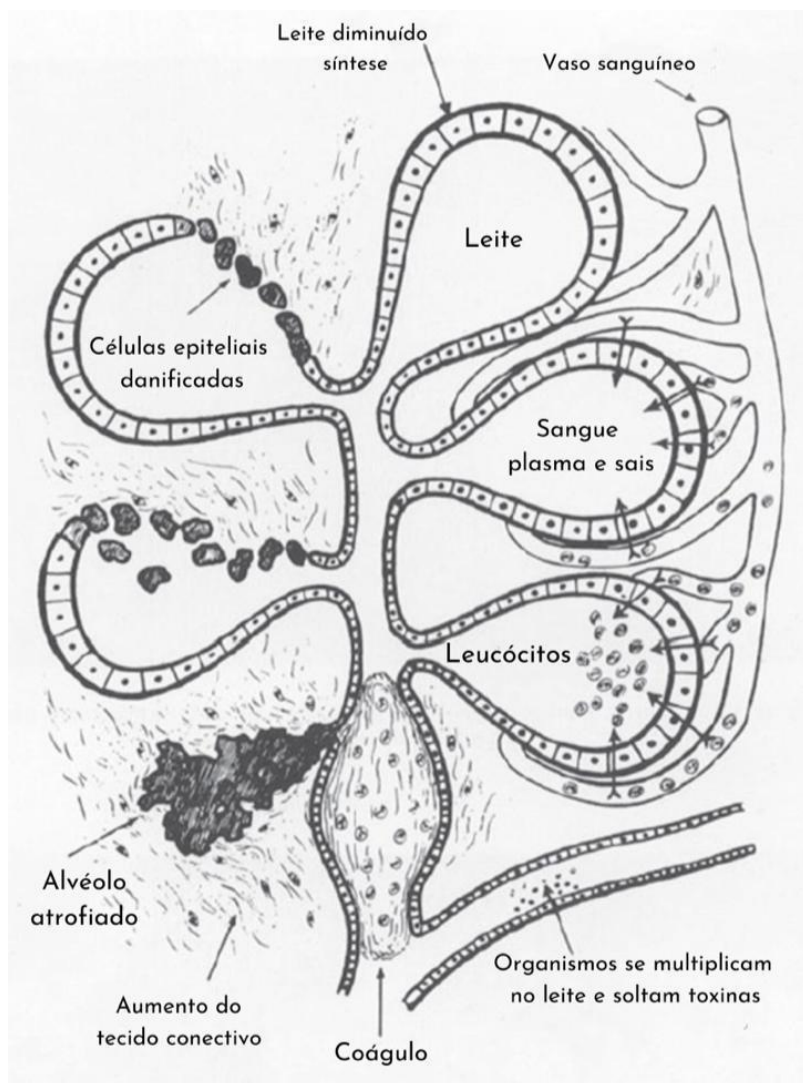


Figura 9: Danos teciduais ao epitélio mamário em decorrência de processo inflamatório durante quadros de mastite. Fonte: Harmon (1995).

Wellnitz *et al.* (2015) reportaram a rápida alteração da permeabilidade da barreira hematológica em resposta à mastite experimental induzida por administração de lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli*. Albumina, IgG1 e IgG2 aumentaram rapidamente no leite nas duas primeiras horas após o desafio, e atingiram platô cerca de três

horas após o desafio. Não foi observada alteração desses componentes no sangue. Em contrapartida, o aumento de células somáticas começou a ser notado tardiamente, e atingiu platô a partir de cinco horas após o desafio (**Figura 10**).

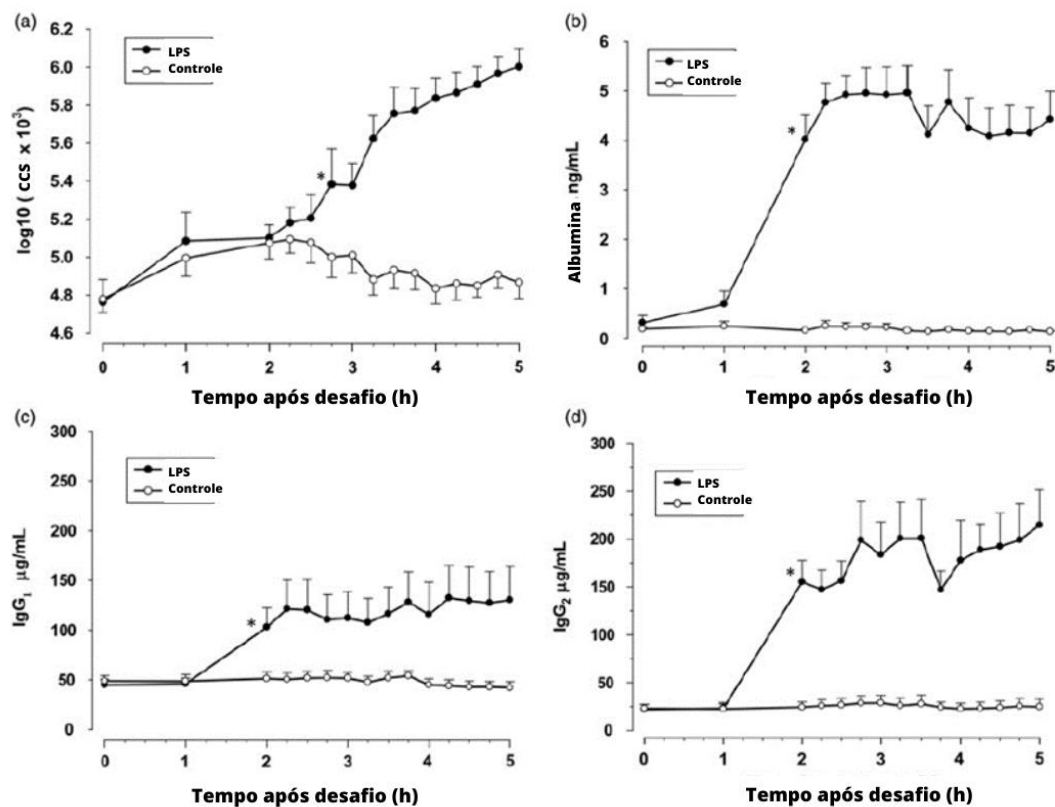


Figura 10: Concentração de células somáticas (a), albumina (b), imunoglobulina G tipo 1 (IgG1, c) e IgG2 (d) em quartos mamários infectados experimentalmente pela administração de LPS (*Escherichia coli*). Fonte: Wellnitz *et al.* (2015).

A resposta mais lenta associada à infiltração celular indica maior tempo necessário para expressão de receptores e alterações morfológicas na superfície endotelial e das próprias células para que a diapedese ocorra de forma mais ampla, enquanto se destaca a rapidez da resposta associada aos mecanismos de permeabilidade da barreira hematológica. Quanto a isso, Wellnitz *et al.* (2015) reforçaram ainda que a permeabilidade dessa barreira sofre alterações fisiológicas que podem ser identificadas pela presença de α -lactoalbumina no sangue, proteína mamária presente no leite, que pode ser encontrada no sangue devido ao fluxo reverso quando

a barreira hematológica está aberta, com retorno a valores basais em, aproximadamente, duas horas. Essa variação pode ser naturalmente encontrada entre ordenhas, uma vez que o úbere cheio altera a permeabilidade e a adesão das junções celulares (Baumrucker *et al.*, 2021). No experimento em questão, a concentração de α -lactoalbumina no sangue aumentou de cerca de 450 ng/mL para, aproximadamente, 900 ng/mL nas primeiras horas após o desafio (**Figura 11**).

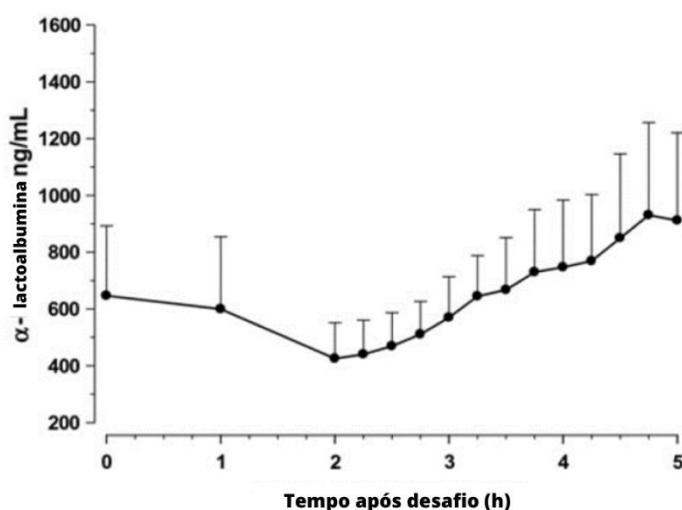


Figura 11: Concentração de α -lactoalbumina no sangue devido ao aumento da permeabilidade endotelial em resposta à infecção experimental com lipopolissacarídeo (LPS). Fonte: Wellnitz *et al.* (2015).

Embora essas vias de passagem pareçam cômodas e favoráveis à transmissão de patógenos intracelulares de eritrócitos e leucócitos, outros mecanismos poderiam ser importantes, como os associados a receptores para passagem transmembrânica. Em revisão de literatura, Baumrucker e Bruckmaier (2014) apontaram as principais descobertas relacionadas ao transporte de IgG1 baseada em transcitose, com participação essencial de complexo de receptores (FcRn) presentes nas células epiteliais alveolares mamárias, capazes de promover ligações com as imunoglobulinas e albumina. Isso sugeriria que a albumina possa utilizar a transcitose, não apenas a passagem direta pelas junções celulares mais permeáveis.

Diante dessas questões e sabendo-se da presença de outros tipos de patógenos em colostro e leite, torna-se importante a investigação de hemopatógenos de eritrócitos nesses fluidos, a partir da hipótese de que hemácias parasitadas e formas livres dos agentes na circulação possam atravessar as barreiras da glândula mamária. Apesar da descrição clássica de vias citadas anteriormente para constituintes de forma geral, não foram encontrados estudos que tratem de mecanismos ou outras informações acerca da passagem de eritrócitos do leito vascular materno para o ambiente intramamário ao se pesquisar os seguintes termos: “red blood cells into mammary gland”, “red blood cell pass to mammary gland”, “transporte de hemácias”, “red blood cells albumin” ou “red blood cells in milk”.

4.4. Resposta imune e infecção por hemopatógenos

O sistema imune atua de formas distintas e conta com vários elementos e componentes para proteção do organismo. O primeiro e consistente mecanismo é constituído pelas barreiras protetoras, epiteliais e mucosas, dotadas de infinidade de células e microrganismos simbióticos que auxiliam o organismo animal a se defender contra invasão de antígenos (Vlasova e Saif, 2021). Antígenos são tudo o que pode causar injúria ou dano tecidual. Nesta revisão destacam-se os de origem microbiológica.

Uma vez que ultrapassa a primeira linha de defesa, o microrganismo invasor está em contato com as defesas secundárias, formadas por variedade de mecanismos celulares e químicos (Vlasova e Saif, 2021), cujos objetivos são reconhecer, eliminar o agressor e restabelecer a integridade e homeostase. Para tanto, o sistema imune dos mamíferos conta com duas principais formas de atuação: inata e adaptativa, inespecífica, em que atuam diversos componentes celulares e não celulares, e específica, que demanda complexa interação entre linfócitos T e B, respectivamente (Barrington e Parish, 2001). Elementos de defesa ditos não imunes incluem enzimas, ácidos, lipídeos e microrganismos comensais (Barrington e Parish, 2001).

Para que se torne apto a responder às injúrias o sistema imune passa por fase de desenvolvimento e amadurecimento. No caso dos bovinos, seu desenvolvimento é iniciado na vida intrauterina, nos primeiros dias de gestação (**Figura 12**). Aos 41 d de idade gestacional, tem início o desenvolvimento do timo, órgão fundamental para seleção e maturação de

linhagens de linfócito T (Cortese, 2009), essenciais para respostas inatas e adaptativas que o organismo animal terá que montar ao longo da vida, na medida que for exposto a antígenos das mais diversas origens (Vlasova e Saif, 2021). Ainda no primeiro trimestre de gestação, os linfócitos B e T maduros migram, fisiologicamente, para baço e linfonodos (Barrington e Parish, 2001), independentemente de infecções intrauterinas. Ao redor do centésimo dia de gestação, os principais órgãos do sistema linfoide estão formados: timo, medula óssea, baço e linfonodos. O timo e a medula óssea são órgãos linfoides primários, capacitados a produzir células imunes. Outros tecidos linfoides importantes, como as tonsilas e placas de Peyer surgirão próximos à metade do segundo trimestre de gestação (Tizard, 2014) e junto aos demais tecidos linfoides, formam os tecidos linfoides secundários. Nesse período também, todas as células do sistema linfocitário já estão formadas e podem migrar até órgãos linfoides secundários (Barrington e Parish, 2001). Também são encontradas moléculas, como as imunoglobulinas (Ig) da classe M (IgM), não específicas. Ao parto, o bezerro possui o sistema imunológico completamente desenvolvido, porém, imaturo.

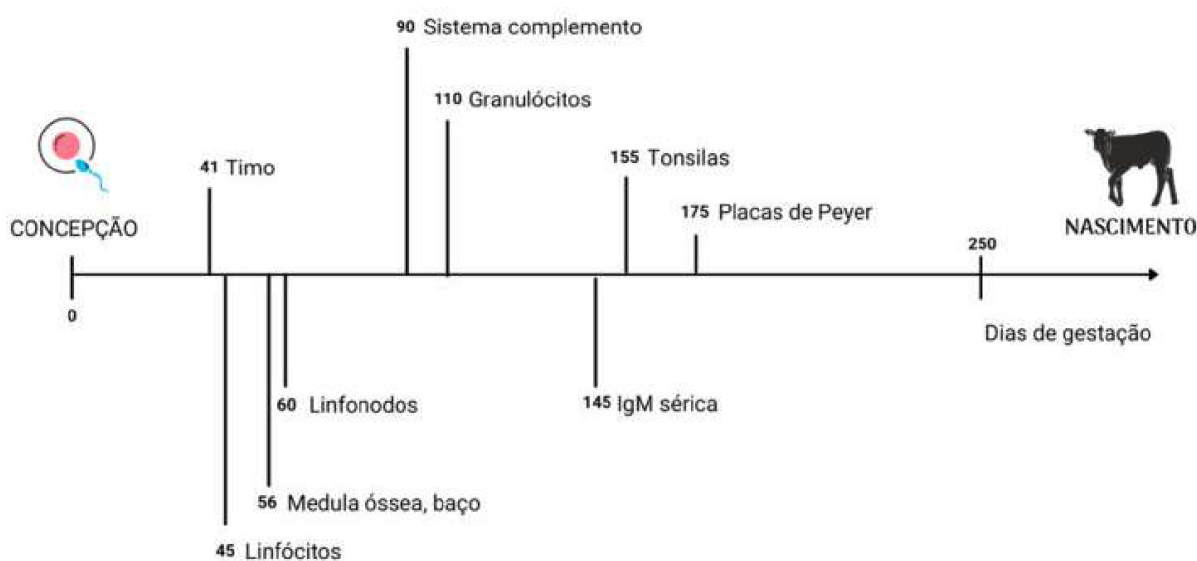


Figura 12: Linha do tempo do desenvolvimento do sistema imune bovino. Fonte: Adaptado de Tizard, (2014), extraído de Costa *et al.* (2022).

Se o desenvolvimento do sistema imune fetal inicia com o começo da gestação, por volta de 40 d com o surgimento do timo, mas só é alcançado em maior plenitude ao redor dos 175 d de gestação (Costa *et al.*, 2022), há um grande espaço temporal e múltiplos cenários imunológicos nos quais os microrganismos podem ultrapassar as barreiras materno-fetais e encontrar o feto ainda com maior suscetibilidade. Dentre as opções, o agente pode atingir o feto antes ou após o período de desenvolvimento, especialmente do timo. O timo é importante tecido do sistema imune do neonato bovino, responsável pela maturação e seleção de linhagens de linfócitos T virgens a partir dos timócitos. Essas fases compreendem período no qual os linfócitos são apresentados ao que chamamos conceito de próprio e não próprio, para que possam estar aptos a reconhecer os mais diversos antígenos (Janeway Jr. e Medzhitov, 2002). Do ponto de vista epidemiológico, este seria um dos piores momentos para uma invasão patogênica, pela possibilidade de reconhecimento do agente como próprio, e não reconhecimento pelo sistema imune do feto, que pode vir a ser um portador assintomático.

Por outro lado, o timo está completamente desenvolvido na metade do primeiro trimestre de gestação (Cortese, 2009), assim como demais órgãos linfoides e as linhagens celulares. Em condições ideais, em um útero estéril, o sistema imune está desenvolvido, mas ainda não é totalmente maduro e não possui experiência antigênica. Porém, em infecções ocorridas a partir desse momento, o feto apresenta aparato necessário para responder ao desafio antigênico, e o sucesso ou insucesso dos mecanismos de defesa dependerá de outros fatores, como biologia e patogenicidade do agente, condição nutricional fetal e exposição a situações de estresse. Segundo Barrington e Parish (2001), a atividade celular na vida fetal e logo após o nascimento contribui pouco para as defesas do neonato, com isso, qualquer infecção ainda seria arriscada e potencialmente fatal.

A morte fetal ou perinatal é um dos principais fatores que determinam prejuízos em sistemas de criação (Vlasova e Saif, 2021). A resposta aos antígenos na vida intrauterina varia com o período de gestação e o tipo de antígeno. Em resumo, conforme revisado por Barrington e Parsih (2001), aos 120 d de gestação o feto consegue responder com produção de anticorpos a alguns vírus, mas não a bactérias, e aos 190 d de gestação é capaz de produzir anticorpos. Em linhas gerais, esses autores resumem que a infecção congênita pode resultar em: morte por sistema de defesa ainda ineficiente; infecção do feto tendo como resultado animal persistentemente infectado, quando o agente ou falha imunológica determina imunotolerância

ou hiporresponsividade ou, por fim, resposta imune eficiente em que o feto consegue controlar a infecção com produção de resposta celular e/ou humoral.

A fim de reunir modelos importantes de interação imunológica materno-fetal, Vlasova e Saif (2021) trouxeram em sua revisão o esquema representado na **Figura 13**. Nele é possível observar a interferência de fatores imunes e não imunes sobre a modulação imunológica. Ao início da gestação, células mononucleares como macrófagos e linfócitos (PBMC) estão presentes em maior concentração no sangue periférico da gestante, assim como as plaquetas. No entanto, a sinalização iniciada pelo feto pela produção de interferon-tau (IFN- τ) e outros mediadores desencadeiam respostas anti-inflamatórias para evitar regressão do corpo lúteo e induzir mecanismos de tolerância uterina, bem como inibição da atividade de diferentes linhagens de células imunes. Dessa forma, IFN- τ estaria envolvido em regulação imune sistêmica materna para favorecer a permanência do feto e seu desenvolvimento.

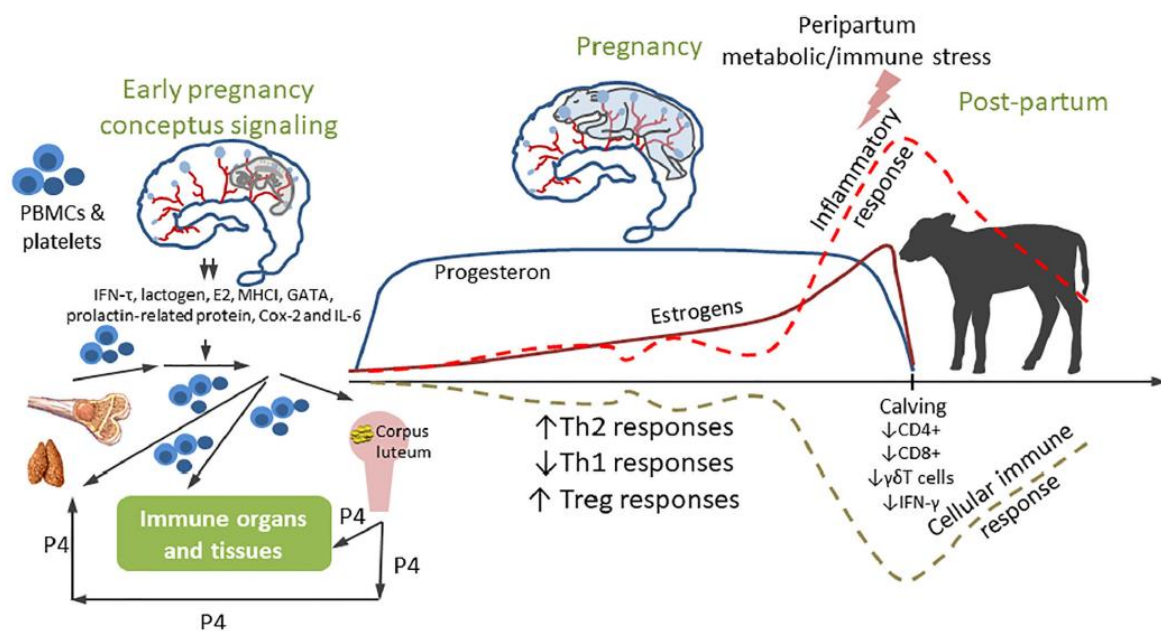


Figura 13: Modulação imune durante a gestação bovina, perfil hormonal e relação materno-fetal. Fonte: Vlasova e Saif (2021).

Perfil de citocinas produzido durante a fase inicial, impulsionado pela presença de progesterona induz expressão de resposta Th2 e regulatório (Treg) ao longo de quase toda a gestação, invertendo-se apenas próximo ao parto, quando sobressai o perfil Th1. No periparto, a atividade celular e produção de Ig está diminuída. Esses fatores interferem em alguns manejos, como a vacinação com intuito de produzir anticorpos que serão transferidos para o colostro e fornecerão proteção aos bezerros (Vlasova e Saif, 2021).

De forma semelhante, é preciso pensar em como esse perfil hormonal e imunológico pode vir a afetar as infecções latentes e a capacidade dos mecanismos maternos de controlar infecções agudas ou recidivas. Nesse sentido, o período de maior risco para infecções poderia ser pensado para o primeiro e segundo trimestres, quando se tem maior interferência de respostas regulatórias, limitando recursos pró-inflamatórios e “sentinelas”. Ao mesmo tempo, tem-se maior expressão de linfócitos Th2, menos participativos nas respostas celulares, e mais eficientes, principalmente, contra patógenos intracelulares.

Por outro lado, o aumento de perfil Th1 próximo ao parto poderia induzir reações menos direcionadas, dado o efeito de imunossupressão, deixando passar algum mecanismo patogênico despercebido. Como exemplo, conforme demonstrado por Swift e Paumer (1976), fetos de novilhas negativas e posteriormente inoculadas com sangue contendo *A. marginale* podem contrair o agente no terceiro trimestre de gestação. No entanto, esse caso parece ser diferente dos mecanismos envolvidos em casos de animais portadores de *A. marginale*, embora esses também contribuam para taxa de transmissão vertical.

A placenta sinepteliocorial dos bovinos não permite a passagem de macromoléculas, como as imunoglobulinas, o que faz com que nos primeiros meses de vida extrauterina a principal defesa do neonato bovino seja a imunidade passiva, adquirida pela ingestão do colostro bovino, rico em Ig (Godden, 2008; Raboisson *et al.*, 2016; Lombard *et al.*, 2020). Nos primeiros dias após o nascimento, o efeito do cortisol produzido pelo feto dentro do útero ainda pode provocar certa supressão imune, principalmente sobre as células fagocíticas e apresentadoras de antígenos (Chase *et al.*, 2008).

Ao nascimento, a concentração de linfócitos B circulantes pode chegar a 30% do total observado em animal adulto (Barrington e Parish, 2001) e, assim como outros tipos de células linfoides, a maturidade imunológica depende da exposição gradual aos mais diversos antígenos presentes no ambiente. Na medida que experimenta o contato com diferentes antígenos e o

perfil hormonal se altera, as células do sistema imune inato, especialmente as fagocíticas, adquirem maior avidéz e aumentam seu nível de atividade. As primeiras imunoglobulinas endógenas podem ser notadas a partir das primeiras 24h, principalmente representadas pela classe M, produzidas localmente na mucosa intestinal e não específicas. A partir desses primeiros contatos entre hospedeiro-antígenos, ao redor da segunda semana de idade (**Figura 14**), o perfil das respostas se assemelha ao observado em animais mais velhos (Barrington e Parish, 2001). Apesar disso, a plena maturidade imunológica no bovino se dá ao redor dos nove meses de idade (Costa *et al.*, 2022).

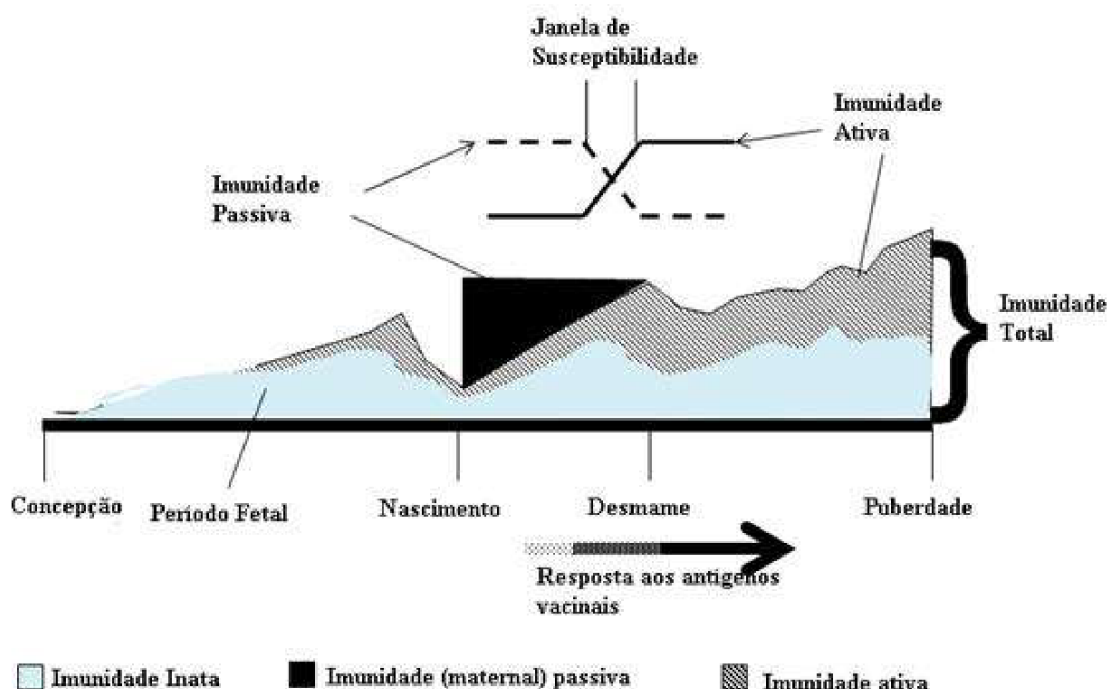


Figura 14: Desenvolvimento temporal do sistema imune em bovinos e estado imunológico.
Fonte: Adaptado de Chase *et al.* (2008), extraído de Costa *et al.* (2022).

Os neonatos bovinos apresentam perfil diferenciado de linhagens de linfócitos T quando comparados aos bovinos adultos. Nos animais jovens, os linfócitos T potencialmente geradores de linfócitos TCD4+, essenciais para as respostas imunes efectoras contra agentes bacterianos e intracelulares estão presentes em maior percentual, situação que se inverte na vida adulta

(Vlasova e Saif, 2021). Isso, provavelmente, confere ao animal jovem uma maior capacidade de resposta contra determinados tipos de infecção.

A resposta imune efetora, dotada de anticorpos e células de memória depende de equilíbrio entre redes de interação formadas por elementos do sistema imune inato e adaptativo, bem como de diversidade de fatores imunes e não imunes, como citocinas, quimiocinas, receptores de membrana, gradiente de concentração, injúria tecidual e pH do meio. O objetivo dessas interações é o desenvolvimento de imunidade celular específica mediada, que pode ser do tipo mediada por células (celular) ou mediada por anticorpos (humoral) (Tizard, 2014). No caso de alguns agentes, como *A. marginale*, a resposta mais efetiva é a que envolve ambas essas vias, constituída de resposta mediada por células T de perfil Th1, associada à produção de IgG2 anti-proteínas específicas de *A. marginale* (Salinas-Estrella *et al.*, 2022).

Independentemente da idade do animal, o mecanismo de defesa inato é o primeiro a ser ativado quando o patógeno penetra o organismo hospedeiro. Isso ocorre porque seus elementos (células dendríticas, macrófagos, células *natural killer*, sistema complemento e outros) estão formados, prontamente disponíveis e circulam todo o corpo constantemente (Costa *et al.*, 2022). Não por acaso, as células citadas têm por uma de suas funções a apresentação de antígenos às células T, funcionando como ponte entre os mecanismos inato e adaptativo. A apresentação de antígenos, constituintes do agente agressor, é possível em decorrência da fagocitose do agente, que fornece sequências específicas processadas pela célula apresentadora de antígenos (do inglês *antigen presenting cells* – APC), externalizadas via membrana celular.

Muitas dessas sequências podem ser comuns a diferentes microrganismos, o que torna esses segmentos padrões para algumas espécies, famílias ou gêneros. Por exemplo, ao serem fagocitadas, diferentes bactérias Gram-negativas irão dar origem a sequências que permitem o reconhecimento de lipolissacarídeos de membrana (LPS). Isso irá direcionar o sistema imune para produção de perfil de citocinas, recrutamento celular e outros fatores imunes que melhor atendam a esse padrão de infecção, porém, uma resposta específica só será gerada mais tarde, com estímulos direcionados a populações de linfócitos B. Essa resposta é um pouco mais tardia, pois demanda co-estimulação pelos linfócitos T já sensibilizados.

Esses padrões sequenciais são denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). Para que o processo inicial de reconhecimento ocorra, as células de defesa são dotadas de inúmeros receptores de superfície, cada qual com suas características que

permitem identificação de um PAMP. Esse reconhecimento é feito por receptores de reconhecimento de padrões (PRR), como os *toll like receptor* – TLR, estruturas transmembrânicas glicoproteicas, e os *T-cell receptor* – receptores de células T (TCR) (Janeway Jr. e Medzhitov, 2002; Tizard, 2014). Essas classes de receptores, por sua vez, apresentam diferentes conformações e são divididas de acordo com a afinidade por determinados PAMP. Outro padrão comumente descrito refere-se aos padrões moleculares associados a danos (DAMP), ou seja, padrões encontrados em situação de injúria tecidual, quando há danos aos componentes teciduais, seja pelo agente agressor ou pelos efeitos colaterais da resposta imune.

Em bovinos, são relatados como funcionais TLR1 a TLR10 (Tizard, 2014). *Toll like receptor* tipos 1, 2, 4, 5, e 6 estão associados, principalmente, à identificação de proteínas, lipoproteínas e lipopolissacarídeos bacterianos e fúngicos, enquanto TLR 3, 7, 8, 9 e 10 reconhecem, principalmente, ácidos nucleicos virais e bactérias. No contexto desta discussão, provavelmente, TLR9 seja o mais importante, dado que sua principal função é o reconhecimento de DNA de bactérias intracelulares.

Ao se ligar a um PAMP, a célula portadora do TLR emite sinais químicos, principalmente via citocinas, interleucinas (ILs) e quimiocinas, que funcionam como complexos de sinalização, desencadeando cascatas de transdução de sinal e produção de moléculas pró e anti-inflamatórias (Vlalsova e Saif, 2021). As cascatas de sinalização fornecem os estímulos necessários para iniciar a modulação da resposta imune. A partir delas haverá recrutamento linhagens fagocíticas, atração de linfócitos T e direcionamento do perfil de resposta exibido pelos linfócitos T, fundamentais para as respostas imunes efetoras específicas. Durante essa interação inicial, a liberação de moléculas como IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) está associada aos sinais clínicos inespecíficos: hipertermia, anorexia e depressão, além de aumento da síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado e aumento da produção de diferentes tipos de leucócitos (Nazifi *et al.*, 2012).

Diante da gama de meios de sinalização que podem ser gerados frente a diferentes desafios antigênicos, os perfis de secreção de mediadores químicos afetam o perfil de população de linfócitos selecionado/estimulado. Com isso, tem-se conhecimento de diversas subpopulações de linfócitos T (**Figura 15**), capazes de se associar a perfis de resposta, a que chamamos Th, acrescido de um número. Nesse contexto, cada número representa um perfil de

mediadores químicos e direcionamento mais restrito na resposta imune. As subpopulações dizem respeito à predominância de receptores de células T (TCR) de tipos diferentes, sendo os mais comuns $T\alpha/\beta$ e $T\gamma/\delta$, que dão origem às linhagens CD4, também chamados linfócitos T auxiliares, e CD8, ou T citotóxicos, respectivamente. A partir de TCD4, tem-se perfis de resposta Th1, Th2 e Th17, bastante conhecidas como representantes de resposta com perfil mais celular, humoral e regulador/resolutivo, respectivamente. Por outro lado, TCD8 estão mais associados a mecanismos citotóxicos, reguladores e de memória.

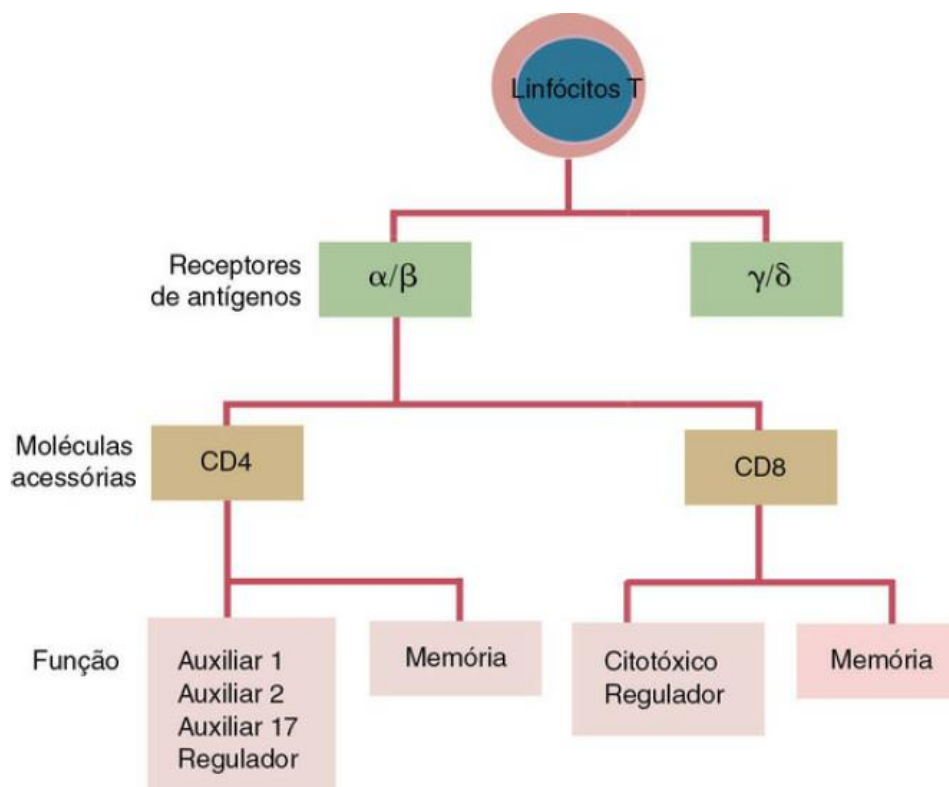


Figura 15: Subpopulações de linfócitos T e perfis de resposta comumente associados. Fonte: Tizard (2014).

Os linfócitos T γ/δ são encontrados em proporções distintas em bovinos, a depender da idade. Em animais jovens, esses podem chegar a 40% dos linfócitos T circulantes, enquanto no animal adulto representam de 10 a 15% (Tizard, 2014). Interessante observar que esse tipo de linfócito T tende a produzir respostas Th1 devido ao perfil de liberação de moléculas IL-1, IL-12, TNF- α e IFN- γ . Esses elementos são descritos como essenciais na resposta imune à

anaplasmose, por exemplo. Em adição, podem ter participação na maior resiliência nos quadros clínicos em animais jovens quando comparado a adultos.

Além dos receptores já citados, os linfócitos apresentam complexos de receptores acoplados aos TCR e TLR (Janeway Jr. e Medzhitov, 2002), chamados CD3, para transdução de sinais ao interior da célula, sem os quais não seria possível dar continuidade à cascata de eventos após reconhecimento do PAMP. No caso de mecanismos de imunidade efetora, é necessário que os linfócitos T depois desse momento, apresentem os antígenos aos linfócitos B, fazendo a ponte entre os dois mecanismos de resposta. Perfil de secreção de mediadores químicos também são fundamentais nesse momento. Os linfócitos B reconhecem os antígenos por meio de ligação entre receptores transmembrânicos, e, a partir dos perfis estimulatórios proliferam e se diferenciam, passando por processos de expansão clonal (Janeway Jr. e Medzhitov, 2002), que darão origem tanto a linhagens de células de memória, quanto aos plasmócitos, responsáveis pela produção de Ig (**Figura 16**).

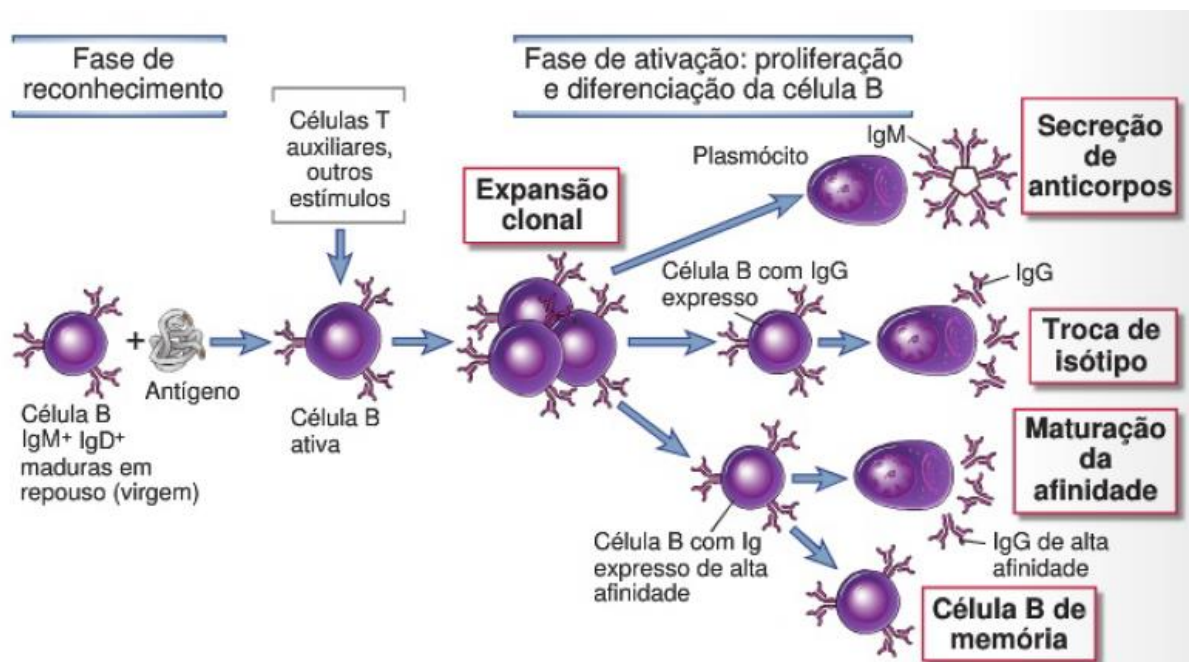


Figura 16: Apresentação de antígeno a linfócito B, com participação de linfócito T auxiliar, seguida por fase de ativação e diferenciação de linfócitos B. Fonte: Abbas (2012).

Devido à menor atividade imunológica nas primeiras semanas após o nascimento, imagina-se que a imunidade contra TPB nos bezerros esteja muito condicionada à presença de anticorpos específicos no colostro e capacidade de absorção desses pelo recém-nascido. Dessa forma, torna-se importante que em propriedades endêmicas o colostro fornecido ao neonato seja oriundo da própria fazenda e o uso de substitutos comerciais ou colostro natural oriundo de outra propriedade seja feito com cautela. No entanto, estudos que avaliaram efeito de anticorpos passivos sobre infecção demonstram que administração de soro hiperimune por si não foi capaz de controlar o aumento da ricketsemia de *A. marginale*, em animais esplenectomizados ou não, como de Gale *et al.* (1992).

Echaide *et al.* (2005) relataram presença de anticorpos anti-MSP5, umas das proteínas de superfície de membrana encontradas em estirpes de *A. marginale* em amostras de leite. Porém, considerando o restrito período de absorção de imunoglobulinas pelo recém-nascido, não se pode dizer muito sobre a importância desses anticorpos na proteção para os bezerros. Os anticorpos produzidos pela mãe são transferidos da circulação sanguínea da fêmea para o colostro nas quatro ou cinco semanas que antecedem o parto, durante a colostrogênese (Barrington e Parish, 2001; Baumrucker *et al.*, 2021). Para tanto, é preciso que essa vaca tenha sido exposta a agentes específicos em momento anterior, que permita tempo hábil para produção desses. Em propriedades endêmicas e em situação de estabilidade enzoótica a presença de anticorpos anti-*A. marginale* no colostro, por exemplo, é comum. Porém, em áreas de instabilidade enzoótica em que poucos animais são expostos ao agente, essa probabilidade é reduzida.

Potgieter e Van Rensburg (1987) estudaram a transferência de imunidade à *Anaplasma* sp. em bezerros nascidos de vacas infectadas, ambos mantidos sob condições experimentais livres de carrapato. Para a maior parte dos animais avaliados, anticorpos anti-*Anaplasma* foram detectados no soro, em média, até 8 semanas de idade, enquanto para os demais, até 12 semanas. No último caso, os autores sugerem que a permanência mais duradoura dos anticorpos tenha sido efeito de transmissão vertical de *Anaplasma*, que foi detectada em 15,4% dos bezerros (4/26). Somado a isso, observa-se no colostro proporção geral maior para IgG1 quando comparada à IgG2, que é mais expressiva no sucesso ao combate à *A. marginale*. Essa diferença provavelmente estaria associada aos mecanismos de transferência dessas IgG da circulação materna para a glândula mamária (Barrington e Parish, 2001; Baumrucker *et al.*, 2021).

Dessa forma, mesmo com a passagem de anticorpos, alguns animais podem estar descobertos e necessitar lançar mão de mecanismos próprios para proteção. Nesse caso, a presença do timo, maior proporção de linfócitos T γ/δ e atividade esplênica podem ser aliados na promoção de resposta imune efetora. A participação do baço na resposta imune à hemopatógenos, por exemplo, pode ter papel importante, uma vez que esse é um reconhecido local de interação entre a imunidade celular e humoral, além de local de intensa fagocitose de eritrócitos. Sua importância fica ainda mais clara nos animais esplenectomizados, que sucumbem rapidamente à infecção por *Anaplasma*, por exemplo (Klaus e Jones, 1968).

Por ser patógeno intracelular, espera-se que resposta imune a hemopatógenos como *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina* e hemoplasmas não seja dependente da atuação de outras linhas de frente do sistema imune, como MHC-II, receptor associado à exposição de antígenos extracelulares (Palmer *et al.*, 1999; Kocan *et al.*, 2002; Salinas-Estrella *et al.*, 2022). Porém, há apresentação de antígenos intracelulares pelo MHC-I, conhecido em outras infecções pelo importante papel na apresentação de antígenos a linfócitos, inclusive os do tipo B. Por esse motivo também, a resposta imune mediada do tipo Th1 é fundamental na imunidade efetora, uma vez que esse é o perfil de resposta direcionado a microrganismos intracelulares. No entanto, a complexidade da resposta imune permite interação com perfil de resposta Th17 e Th2, essenciais para produção de resposta imune regulada e mediada por anticorpos, mesmo quando a resposta Th1 predominante. Em adição, sabe-se que Th2 tem importante papel na resposta à anaplasiose, por exemplo.

Brown *et al.* (1998) avaliaram resposta imune mediada por células, a fim de confirmar as hipóteses acerca da necessidade de resposta conjunta de células T e B na proteção efetiva contra *A. marginale*. As MSPs 1, 2 e 3 estimularam células mononucleares em bezerros imunizados. As proteínas foram reconhecidas por células T, de modo que a resposta coordenada Th1 com indução de IgG2 pareceu ser eficaz na proteção quando bezerros são desafiados após imunização completa. Além disso, as melhores respostas ao desafio com estirpe Florida foram observadas na presença de maiores títulos de IgG2, que demonstram papel central deste componente na resposta imune efetora.

Anticorpos específicos contra principais epítomos são essenciais para proteger contra os principais sinais clínicos da anaplasiose (anemia e riquetsemia aguda), por isso o modelo mais aceito devido às melhores respostas em estudos conduzidos com infecções naturais e

experimentais de bovinos por *A. marginale* é que outros componentes da resposta inicial são essenciais, como a produção de IFN- γ pelas células T CD4+, uma vez que a presença do interferon aumenta a produção de IgG2 pela indução de linfócitos B, além da ativação de macrófagos (Palmer *et al.*, 1999; Salinas-Estrella *et al.*, 2022).

Nazifi *et al.* (2012) estudaram perfil de proteínas de fase aguda (PFA), IFN- γ e TNF- α em 20 bovinos adultos que apresentaram riquetsemia em infecção natural por *A. marginale*. Animais sem sinais clínicos e com exame parasitológico direto negativo foram usados como controle nesse estudo. Os pesquisadores observaram maior concentração de IFN- γ e TNF- α nos animais com riquetsemia em curso, embora não tenha havido diferença entre os casos mais e menos severos (maior ou menor riquetsemia). Em relação às PFA, animais doentes apresentaram maior concentração de haptoglobina e amiloide sérica A (ASA), sendo que essa última apresentou aumento mais expressivo. Esses parâmetros permaneceram elevados em relação ao grupo controle, porém, não variaram significativamente ao longo do curso clínico da doença. O estudo ressaltou o papel de IFN- γ como ferramenta do sistema imune para sustentação da resposta imunológica na infecção por *A. marginale*, além de destacar a ASA como um possível marcador para diagnóstico da anaplasiose. Porém, é preciso se atentar para fatores que possam somar ao diagnóstico, já que PFA estão presentes em diversos tipos de condições, infecciosas ou não, como em situações de estresse. Como os próprios autores inseriram em sua discussão. Além disso, a dosagem de PFA de forma rotineira não parece ser uma ferramenta muito prática para o campo atualmente.

Embora o mecanismo imune tenha algumas vias elucidadas, ainda é difícil compreender toda a complexidade da resposta imune à anaplasiose, por exemplo, e o motivo de haver animais persistentemente infectados (Brown *et al.*, 1998; Salinas-Estrella *et al.*, 2022). Parte disso pode ser explicada pelas características genômicas do agente, que conferem capacidade de surgimento de variantes, como a oscilação de MSPs durante os ciclos de multiplicação, exemplificado pelo caso das variações de MSP2, que auxilia o patógeno a evadir do sistema imune do hospedeiro. Em adição, as variáveis genéticas encontradas entre regiões e dentro dos próprios rebanhos, ou até a nível individual, representam um grande desafio ao desenvolvimento de imunógenos eficientes e multivalentes, além do risco constante e iminente do surgimento de surtos da doença (Palmer *et al.*, 1999). O que também pode ser um fator associado a outras espécies de hemopatógenos.

4.5. Diagnóstico molecular em colostro e leite de ruminantes

A expressão diagnóstico molecular compreende técnicas moleculares utilizadas para identificação e caracterização de biomoléculas, com larga utilização de DNA e RNA como base para análises. Em linhas gerais, podem abranger pesquisa de microrganismos, pesquisas genômicas de mutação, arranjos cromossômicos, variações genéticas e expressão gênica, dentre outras finalidades. Em Medicina Veterinária, dentre as aplicações mais comuns estão a identificação de microrganismos, tanto em pesquisa científica, quanto na rotina clínica, no diagnóstico de agentes etiológicos e, mais recentemente, o estudo do microbioma em diversas espécies animais. Nesses casos, uma das técnicas mais utilizadas é a PCR, que pode apresentar variações (convencional, *nested*, tempo real).

Embora padronizado e difundido para pesquisa de agentes em diferentes tecidos e fluidos, como o sangue, a aplicação de técnicas moleculares em amostras de leite e colostro nas espécies animais ainda não é amplamente difundida. Com a variedade de protocolos e ausência de reagentes específicos, a manipulação e processamento dessas amostras permanece com pouca ou nenhuma padronização. A indisponibilidade de reagentes específicos para manipulação e processamento dessas secreções lácteas é evidenciada pela variedade de protocolos utilizados na metodologia das publicações (Caldart *et al.*, 2011; Dibbern *et al.*, 2015; Dela Cruz *et al.*, 2019). Em todos esses casos, os autores utilizaram reagentes e soluções de rotina para outros tipos de amostra, como sangue, tecidos e saliva.

Nesse sentido, Lipkin *et al.* (1998) e Gomes *et al.*, (2024) realizaram suspensão em solução salina 0,9 % para centrifugar amostras de leite e colostro bovino, respectivamente, enquanto Dela Cruz *et al.* (2019) realizaram pesquisa de clarificaram amostras de leite por adição de PBS, com subsequente extração de DNA a partir de kit comercial para sangue.

Parte dessas dificuldades relaciona-se à rica composição de nutrientes, células e outras biomoléculas presentes no leite e, ainda em maior quantidade, no colostro (Lindner *et al.*, 2011). Essa diversidade pode comprometer a qualidade do material genético recuperado na extração de DNA pela presença de fatores inibidores de PCR, ou perda de constituintes com afinidade por elementos presentes no sobrenadante descartado.

A maioria dos estudos que executou extração de DNA de amostras de colostro ou leite procedeu etapa prévia de lavagem e clarificação, com intuito de remover gordura e proteínas solúveis que poderiam prejudicar a qualidade dos métodos de extração e PCR. No caso de

colostro bovino, deve-se considerar a variação de composição que ocorre entre o colostro, leite de transição e leite, em que se observam grandes diferenças na quantidade de proteínas, incluindo-se as imunoglobulinas, lactose, gordura, minerais, vitaminas, fatores de crescimento e fatores antimicrobianos. Para colostro, soma-se ainda a variação entre vacas, a depender de fatores individuais, como estado de saúde, nutricional e imunológico, ordem de parto, dentre outros, bem como os coletivos associado ao manejo e ambiente, como conforto térmico, instalações, esquema vacinal e outros. Nesse sentido, o volume inicial da amostra (5 a 25 mL; Gonzalez *et al.*, 2013; Dela Cruz *et al.*, 2019) poderia ser um fator que influenciasse a qualidade do material recuperado, uma vez que se observa nos estudos volumes fixos de amostra e solução, não considerando a diferença de densidade e composição que pode haver entre os animais. Estudos futuros que associem essas informações aos protocolos e parâmetros de qualidade avaliados podem ser úteis para auxiliar nessa compreensão.

Dentre as técnicas frequentemente utilizadas para controle interno de extração de DNA estão concentração de DNA (ng/ μ L) e índice de absorvância A260/280, mensurado em espectrofotômetro pela razão entre os comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Para A260/280, são encontrados na literatura intervalos entre 1,6 e 2,0, de modo que o mais próximo do ideal seja o valor de 1,8. Quanto menores, os valores podem indicar contaminação por resíduos de reagentes da extração e componentes indesejáveis. Quanto maiores, indicam maior presença de RNA em detrimento do DNA. Outro dentre os métodos mais utilizados para controle é realização de PCR para amplificação e identificação de genes constitutivos, como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e citocromo B mitocondrial.

Em estudo com inoculação de amostras de leite de diferentes origens com *L. monocytogenes*, Peres *et al.* (2010) relataram dificuldade em se obter resultados positivos em PCR para as amostras inoculadas neste tipo de material. Além da diversidade de nutrientes, no caso de amostras frescas, a diversidade de microrganismos também poderia ser um fator negativo quando se objetiva pesquisa de agentes específicos pela redução do DNA disponível (Peres *et al.*, 2010). Caldart *et al.* (2011) compararam três métodos de extração de DNA de sangue e leite de pequenos ruminantes (DNAzol[®], FTA[®] e sílica), a fim de estabelecer um protocolo mais adequado para recuperação de DNA. Após a extração, as amostras foram submetidas a dois tempos de estocagem a -20°C (quatro e nove dias) até a avaliação dos parâmetros de qualidade de pureza (A260/280), concentração de DNA (ng/ μ L) e PCR para GAPDH.

Em estudo que comparou quatro métodos de extração de DNA em amostras de leite bovino (AxyPrep[®], Qiagen[®], coluna de sílica e fervura na coluna de sílica) Dibbern *et al.* (2015) relataram que o método realizado com reagente e protocolo para isolamento de DNA Qiagen[®] foi o que apresentou melhor relação de pureza A260/A280 ($1,76 \pm 0,136$; $P = 0,021$) e coeficiente de variação inferior a 5%. Porém, não houve diferença entre os métodos ao comparar a concentração de DNA (ng/ μ L) e ciclos de limiar para amplificação de citocromo B mitocondrial bovino. Um diferencial deste estudo em relação aos demais foi não ter sido realizada prévia clarificação como requisito para iniciar os protocolos de extração, o que pode ter influenciado na qualidade do material obtido com esses métodos.

Uma das possibilidades para o estudo de Dibbern *et al.* (2015) é que os reagentes do kit Qiagen[®] tenham sido mais eficientes na remoção de inibidores, enquanto os demais talvez pudessem ter exibido melhores resultados se houvesse lavagem anterior para remoção do excesso de constituintes do leite. Neste estudo, apenas no protocolo AxyPrep[®] foi observada formação da camada de gordura, que, segundo os autores, pode ter interferido negativamente nos resultados desse protocolo pelo fato de ter sido necessário adentrar essa camada e o sobrenadante com a ponteira para acessar a fração desejada. Contudo, estudos mais recentes continuam utilizando diferentes protocolos (Dela Cruz *et al.*, 2019; Úsuga-Monroy *et al.*, 2021). Um dos fatores, conforme apontado pelos estudos anteriores, pode estar ligado ao alto custo do protocolo Qiagen[®].

Até o momento, pode-se inferir que técnicas de extração de DNA de leite e colostro bovino podem apresentar limiar de parâmetros de qualidade diferentes, que conseguiram resultados de A260/280. É recomendável que seja realizado controle interno para algum dos genes comuns a diferentes linhagens de células do bovino, como GAPDH e citocromo B.

Diante do exposto, o presente trabalho foi subdividido em dois capítulos, organizados em formato de artigo científico, para melhor atender aos objetivos propostos: Capítulo 1 – Avaliação de extração de DNA a partir de colostro bovino descongelado (Evaluation of DNA extraction from thawed bovine colostrum) e Capítulo 2 – Detecção molecular de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and hemotropic *Mycoplasma* em colostro bovino (Molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and hemotropic *Mycoplasma* in bovine colostrum). Os capítulos estão apresentados em sequência após exposição da metodologia geral.

5. MATERIAL E METODOLOGIA

Todos os procedimentos de coleta de material biológico foram aprovados por Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gérias (UFMG), sob o protocolo 222/2022.

5.1. Local de condução e manejos gerais

Foi escolhida para condução do estudo uma propriedade leiteira com histórico de tratamentos para TPB. A fazenda situa-se no sul de Minas Gerais, Brasil (-21.722899675089153, -45.163023077254586). As temperaturas mínima e máxima no período de coleta (abril a julho) foram de 16 e 23 °C, com precipitação mensal entre 13 e 39 mm (Weather Spark). Com rebanho de pouco mais de 1300 vacas Holandês em lactação e média de produção diária de 51.322 L (MilkPoint, 2023), os animais foram criados em sistema de criação de bezerros em gaiolas suspensas; sistema de recria confinada em galpão com acesso a piquete; sistema *free-stall*, com camas de areia, ventilação e aspersão para novilhas e vacas no pré-parto e lactação; e piquete para vacas secas e novilhas gestantes com pista de alimentação (**Figura 17**). O proprietário/representante foi orientado e recebeu e assinou termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo 1**) sobre as coletas necessárias para condução do estudo.

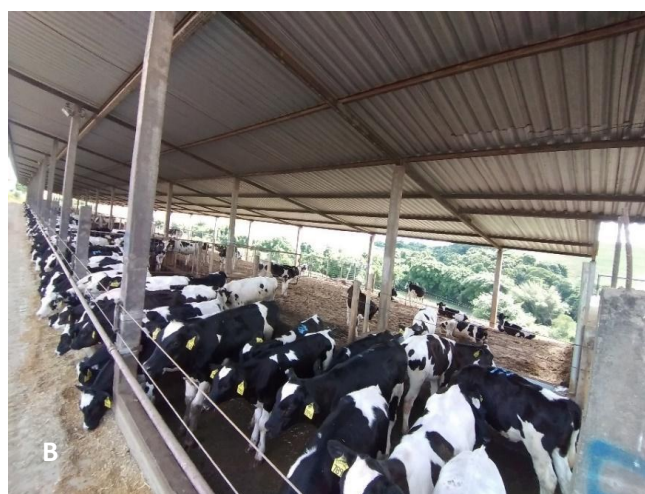




Figura 17: Sistemas de criação na propriedade de condução do estudo: A) Criação de bezerros em gaiolas suspensas; B) Recria de bezerros em galpão com acesso a piquete; C) *Free-stall* com camas de areia, ventilação e aspersão; D) Pista de alimentação e piquete para gestantes e vacas secas.

Logo após o nascimento as bezerras receberam a primeira cura de umbigo com solução de iodo a 10 % e foram transferidas para o bezerreiro coberto com gaiolas suspensas, onde foram criadas individualmente até os 60 dias de idade. As bezerras receberam volume de colostro correspondente a, no mínimo 10 % do peso vivo ao nascimento imediatamente após a chegada ao bezerreiro. O colostro recebido correspondeu a placas descongeladas do colostro total ordenhado do número de vacas que tivesse parido entre os intervalos da ordenha específica do pós-parto. O Brix mínimo do colostro foi de 25 %. A cura de umbigo permaneceu sendo realizada duas vezes ao dia até cura completa. A mochação foi feita por aplicação de pasta cáustica nos dois primeiros dias de idade. Os animais foram alimentados com leite de descarte e ração de alta granulometria, com água à vontade. Foi realizada profilaxia contra coccidiose na primeira semana de idade. Tratamentos de saúde foram realizados de acordo com observação de sinais clínicos, sendo as bases mais utilizadas florfenicol, tulatromicina, dexametasona e flunixinina meglumina. Animais em tratamento recebiam fluidoterapia oral.

Na recria, os animais entre 60 e 240 dias de idade passaram por manejo de prevenção da TPB, em centro de manejo situado no mesmo galpão em que ficam alojados. Esses animais dividiam-se em 13 lotes, de acordo com o peso, de modo que os lotes iniciais tinham acesso restrito aos piquetes, enquanto os intermediários e finais tinham livre acesso. O local tinha muitos anos de uso e histórico reconhecido de infestação por carrapatos. O manejo de TPB foi

realizado três vezes por semana, alternando-se os lotes, de forma que todos os animais foram avaliados pelo menos uma vez por semana, e aqueles com temperatura retal superior a 39,4 °C foram tratados com oxitetraciclina e dipropionato de imidocarb, de acordo com o peso aferido por fita de pesagem e recomendação dos fabricantes. Cerca de 30 % dos animais foram tratados a cada avaliação. Não foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo para pesquisa e confirmação do(s) agente(s). Os animais tratados foram marcados com bastão para facilitar a observação durante as avaliações subsequentes e evitar tratamentos repetidos em curto intervalo de tempo. A partir dos três meses de idade, todos os animais foram vacinados contra clostridioses, raiva, brucelose, rinotraqueíte infecciosa bovina e diarreia viral bovina.

Não foi reportado histórico de TPB nos lotes pós-recrta. Em média, aos 240 dias de idade, as novilhas foram transferidas para galpões, onde permaneceram até confirmação de gestação. A partir dos 350 kg os animais foram considerados aptos para iniciar o protocolo de inseminação artificial em tempo fixo. Após confirmação da gestação, as novilhas foram transferidas para piquete, onde se juntavam às vacas secas gestantes.

O controle de carrapatos foi realizado com aplicação de *pour-on* ou banho, com produto indicado para cada categoria animal, de acordo com detecção de alta carga de infestação por observação visual. Não foram usados critérios ou intervalos específicos. O controle de moscas foi realizado por uso de armadilhas e aspersão diária de produto sobre superfícies, como paredes e pilastras da sala de ordenha.

A higienização de cochos e bebedouros foi realizada uma vez por semana, enquanto a remoção de matéria orgânica foi realizada manualmente nas instalações de cria e recrta; por trator na pista de alimentação das fêmeas secas e gestantes e por *flushing* de água reutilizada nos galpões de *free-stall*, todos pelo menos uma vez ao dia.

Com o objetivo de confirmação da circulação dos agentes de TPB na propriedade para viabilizar a condução do estudo, foram colhidas previamente pelos pesquisadores amostras de sangue de ponta de cauda de bezerras tratadas durante uma semana de acompanhamento do manejo de TPB da recrta. Foram confeccionados esfregaços sanguíneos, corados com Panótico rápido e avaliados por microscopia óptica (aumento de 100 x - óleo de imersão), que confirmou a ocorrência, em ordem decrescente, de *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*.

5.2. *N amostral*

O *N* amostral foi indicado pela proporção estimada de amostras positivas *A. marginale* (valores entre 0 e 100 %), de acordo com metodologia baseada na distribuição binomial. O universo da população amostrada foi de 1300 indivíduos adultos, de forma que a estimativa considerou população de tamanho infinito, utilizando-se a fórmula abaixo:

$$n=(Z_{\alpha/2})^2 * P * (1-P) / d^2$$

Em que: *n* é o número amostral mínimo estimado; $Z_{\alpha/2}$ é o quartil superior da distribuição Normal Padrão que deixa uma probabilidade igual a $\alpha/2$ na cauda direita; *P* é o nível de significância, onde para um valor de $P = 0.05$, o valor de $Z_{\alpha/2}$ é igual a 1,96, e *P* é o valor pré-definido da proporção esperada; *d* é uma estimativa do erro máximo assumido, sendo que para um erro igual a *d*, o intervalo de confiança teve tamanho de 2*d*. Valores pequenos de *d* indicam alta precisão (intervalo de confiança estreito) e, portanto, elevado número amostral.

Utilizando estimativa e supondo prevalência de 11 % de amostras de colostro positivas para *A. marginale*, de forma conservadora, com base na prevalência de transmissão transplacentária observada em estudos anteriores do presente grupo de pesquisa (Meneses, 2013; Andrade, 2021; Coelho, 2022) usados como parâmetro para o cálculo, o tamanho amostral variou de acordo margem de erro (ME) pretendida para o estudo (**Tabela 5**).

Tabela 5: Número de amostras requeridas de acordo com a margem de erro pretendida para o estudo

Número de amostras	Margem de erro
139	±5%
97	±6%
71	±7%
55	±8%
43	±9%
35	±10%

Para escolha, foram considerados período necessário para coleta, custo de insumos e margens de erro, que resultou na seleção de N amostral correspondente à ME de 6 %. Ao N de 97, foram somados 10 %, a fim de evitar aumento da ME por eventuais perdas, de forma que o N amostral final foi de 107 vacas.

5.3. Manejo pré e pós-parto imediato

As novilhas e vacas secas gestantes foram mantidas em piquetes, alimentadas duas vezes ao dia com dieta total em pista de alimentação coberta, sem ventilação/aspersão. Entre 28 a 42 dias pré-parto os animais foram conduzidos para *free-stall*, com camas de areia, ventilação e aspersão, onde receberam dieta total acidogênica. Todas as fêmeas gestantes foram vacinadas com J-Vac®, ScouGuard® 4KC e HIPRABOVIS®4, aos 60 e 30 dias pré-parto. No lote pré-parto os animais foram monitorados 24 h por dia. Aos primeiros sinais de parto, as fêmeas foram conduzidas para baia maternidade, coberta com cama de feno (**Figura 18**). Dentre os animais amostrados, nenhum parto precisou ser auxiliado. Os bezerros foram separados imediatamente. A ordenha do colostro e manejo pós-parto foram conduzidos em dois momentos diários (08:00 h e 16:00 h), dessa forma, as vacas com parto entre os intervalos de ordenha foram reconduzidas para o lote pré-parto. As vacas que pariram próximo aos horários da ordenha permaneceram na baia maternidade e seguiram direto para o manejo pós-parto.



Figura 18: Vaca recém-parida em baia maternidade com cama de feno.

O manejo pós-parto consistiu da contenção individual das vacas em tronco de manejo adaptado para a maternidade. Após contenção, foram realizados corte dos pelos da vassoura de cauda, remoção manual do tampão de queratina, teste de mastite clínica em superfície de fundo escuro pela retirada de três a quatro jatos de colostro de cada quarto mamário, *pré-dipping* com produto à base de iodo, secagem dos tetos; ordenha mecânica do colostro por conjunto acessório e *pós-dipping* com produto à base de ácido-lático. O colostro de todas as vacas ordenhadas no mesmo turno foi direcionado para o mesmo recipiente, com capacidade para 50 L. Imediatamente após a ordenha da última vaca de cada turno, o volume total foi avaliado por refratômetro digital de Brix e congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em embalagens plásticas com capacidade para 2 L até o uso na propriedade.

5.4. Amostras de colostro bovino

Todo o manejo do pré e pós-parto foi realizado pelos colaboradores da propriedade, conforme preconizado na rotina do local. A coleta individual de colostro foi realizada por dois pesquisadores treinados para este fim. Os pesquisadores usaram par de luvas de procedimento novas durante toda a coleta, trocadas ao menos uma vez para cada animal, desinfetadas com álcool 70°. Logo após a realização do *pré-dipping* e secagem dos tetos de cada vaca, um dos

pesquisadores, com as luvas desinfetadas, se posicionou ao lado do úbere pela lateral esquerda das vacas, com seu rosto voltado cranialmente. O orifício de cada teto foi higienizado com algodão embebido em álcool 70°, na ordem: 1° - quarto posterior direito, 2° - quarto anterior direito, 3° - quarto posterior esquerdo e 4° - quarto anterior esquerdo, a fim de evitar contaminação.

O outro pesquisador abriu a embalagem contendo tubo Falcon estéril (50 mL) para que o primeiro retirasse o tubo da embalagem. Para evitar a troca de mãos e risco de contaminação da amostra, a abertura e o fechamento da tampa do tubo foram realizadas com a mesma mão que segurou o tubo e a tampa, evitando-se deixar o tubo totalmente aberto; enquanto a outra foi utilizada apenas para a ordenha dos quartos. Os quartos foram ordenhados na ordem inversa à utilizada para desinfecção descrita acima. Imediatamente após a coleta, o tubo foi fechado, identificado e congelado a -20 °C (**Figura 19-A**). Apenas uma amostra apresentou coloração sugestiva da presença de sangue, sem sinais visíveis de outras alterações no leite ou no úbere (**Figura 19-B**).

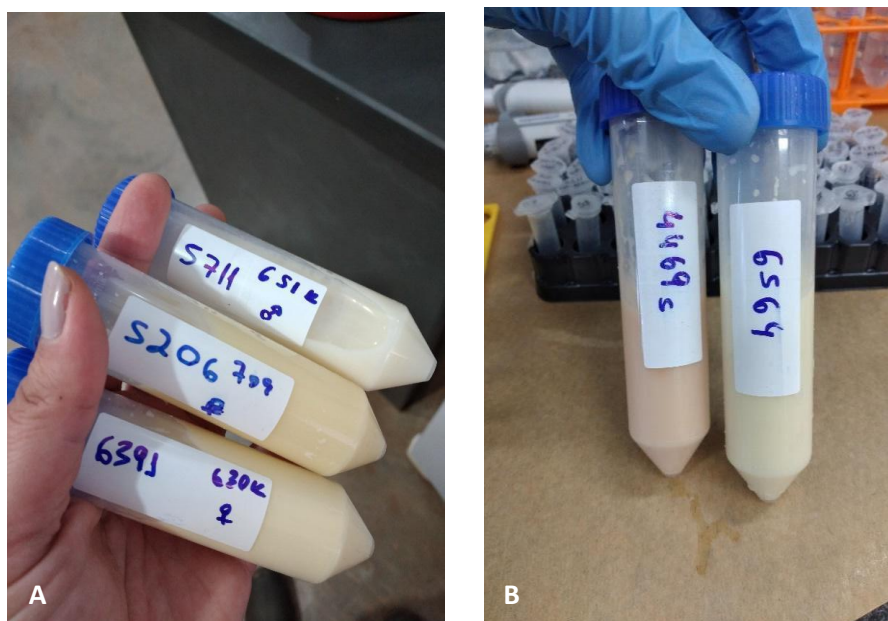


Figura 19: Amostras de colostro. A) Amostras identificadas prontas para congelamento. As luvas já haviam sido retiradas após a coleta. B) Amostra 4469 com coloração rósea, sugestiva da presença de sangue. Foto feita no laboratório, após descongelamento.

Análises laboratoriais

Todas as análises em amostras de sangue e leite foram conduzidas no laboratório de Protozoologia Veterinária - PROTOVET, EV-UFMG.

5.5. Amostras de sangue bovino

As amostras de sangue total foram colhidas individualmente, após a coleta da amostra de colostro de cada vaca, por um dos pesquisadores. O sangue foi coletado em tubo à vácuo com conservante EDTA (5 mL), via venopunção da veia coccígea, após desinfecção com álcool 70°. As amostras foram congeladas imediatamente, a -20 °C.

5.6. Extração de DNA - amostras de sangue

As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente (25 °C) e a extração de DNA nas amostras de sangue total foi realizada com o kit Wizard® Genomic DNA Purification, Promega (São Paulo, Brazil), de acordo com recomendações do fabricante.

5.7. Extração de DNA - amostras de colostro

Protocolo 1

Após descongelamento, as amostras foram homogeneizadas e 7 mL de colostro foram transferidos em alíquotas para tubo Falcon (15 mL), onde foram adicionadas 7 mL de solução fisiológica estéril NaCl 0,9 % (**Figura 20**). As alíquotas homogeneizadas foram centrifugadas a 3000 g, a 25 °C, por 20 minutos, para separação da fração celular. Após centrifugação, as alíquotas foram refrigeradas (4 °C) por 30 minutos para separação completa do sobrenadante, resultando no processo de clarificação, a fim de remover o máximo conteúdo de gordura possível. Algumas amostras apresentaram camada de gordura mais espessa, que precisou ser removida manualmente com ponteira de 1000 µL estéril, para posterior remoção do sobrenadante. Nas amostras com camada de gordura fina e vazada foi necessário apenas verter o tubo. Todo o sobrenadante foi removido por inversão dos tubos em movimento único. As amostras foram ressuspensas em 10mL da solução salina, homogeneizadas e centrifugadas 3000 g por 5 minutos. Esse processo de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Após a

última lavagem, a fração celular de cada tubo foi ressuspensa em 5 mL da solução salina e aliqotada em *Eppendorfs* (2 mL).

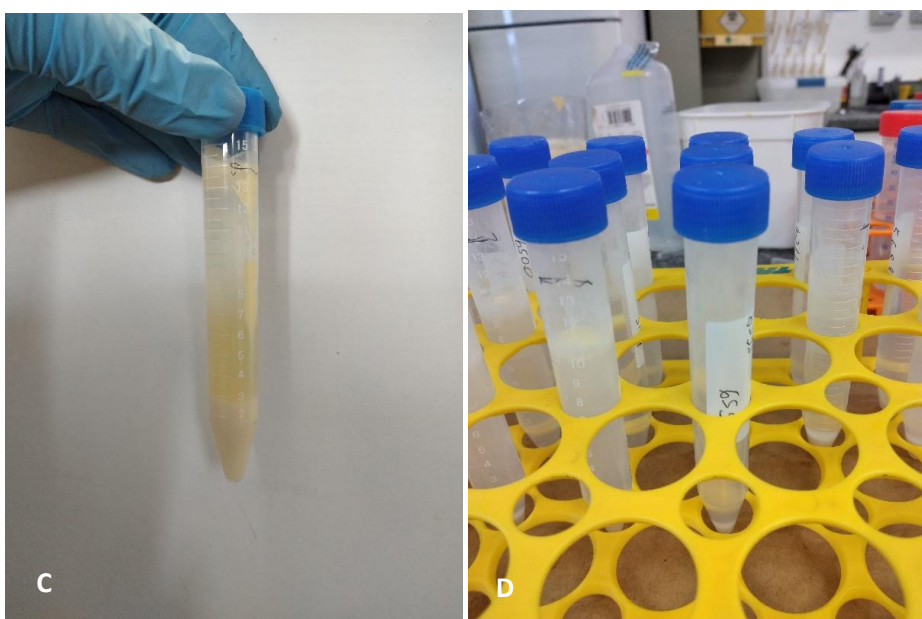
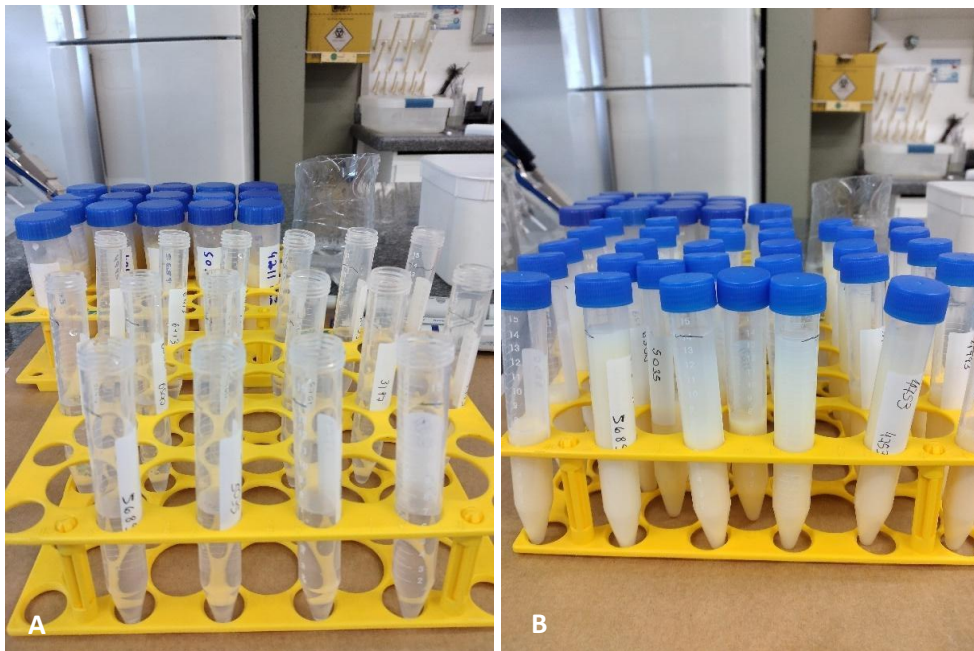




Figura 20: Etapas de lavagem e clarificação, em duplicata, das amostras de colostro. A) Tubos Falcon contendo 7 mL de solução; B) Tubos Falcon contendo 7 mL da amostra composta de colostro de cada vaca; C) Separação das frações da amostra de colostro após adição da solução e centrifugação; D) *Pellet* no fundo do tubo Falcon após segunda etapa de adição de solução e centrifugação e E) *Pellet* final no fundo do tubo Falcon para ressuspensão após todas as etapas da lavagem.

Para extração de DNA do material obtido com o protocolo 1, 300 μ L de cada amostra foram transferidos para tubos estéreis (1,5 mL) contendo 900 μ L de Solução de Lise Celular. O processo de extração de DNA foi realizado com reagentes do kit comercial Wizard®Genomic DNA Purification, Promega (São Paulo, Brazil). O restante do colostro lavado de cada amostra foi armazenado a -20 °C em tubos estéreis (2 mL).

Protocolo 2

Após descongelamento, as amostras foram homogeneizadas e 7 mL de colostro foram transferidos em alíquotas para tubo Falcon (15 mL), onde foram adicionadas 7 mL de PBS 1X (**Figura 20**). O processamento para cada amostra foi feito em duplicata. As alíquotas homogeneizadas foram centrifugadas a 3000 g, sob 5 °C, por 20 minutos, para separação da fração celular. Após centrifugação, as alíquotas foram refrigeradas (4 °C) por 30 minutos para separação completa do sobrenadante, resultando no processo de clarificação, a fim de remover

o máximo conteúdo de gordura possível. Algumas amostras apresentaram camada de gordura mais espessa, que precisou ser removida manualmente com ponteira de 1000 µL estéril, para posterior remoção do sobrenadante. Nas amostras com camada de gordura fina e vazada foi necessário apenas verter o tubo. Todo o sobrenadante foi removido por inversão dos tubos em movimento único. As amostras foram ressuspensas em 7 mL de PBS 1X, homogeneizadas e centrifugadas a 3000 g por 8 minutos, a 5° C. Apenas as amostras que ainda apresentaram sobrenadante turvo foram novamente ressuspensas em 7 mL de PBS 1X, homogeneizadas e centrifugadas a 3000 g por 5 minutos, a 5 °C. Após a última lavagem, a fração celular de cada tubo foi ressuspensa em 4 mL PBS 1X e aliqüotada em *Eppendorfs* (2 mL). O colostro lavado de cada amostra foi armazenado a -20 °C em tubos estéreis (2 mL).

Para extração de DNA do material obtido com o protocolo 1, 300 µL de cada amostra foram transferidos em duplicata para tubos estéreis (1,5 mL) contendo 900 µL de Solução de Lise Celular. O processo de extração de DNA foi realizado com um kit comercial Wizard®Genomic DNA Purification, Promega (São Paulo, Brazil), de acordo com o protocolo de rotina do laboratório de doenças parasitárias (PROTOVET), EV-UFMG. O restante do colostro lavado de cada amostra foi armazenado a -20 °C em tubos estéreis (2 mL).

Para extração de DNA do material obtido com o protocolo 2, 300 µL de cada amostra foram transferidos em duplicata para tubos estéreis (1,5 mL) contendo 900 µL de Solução de Lise Celular. O restante do colostro lavado de cada amostra foi armazenado a -20 °C em tubos estéreis (2 mL). O processo de extração de DNA foi realizado com reagentes do kit comercial Wizard®Genomic DNA Purification, Promega (São Paulo, Brazil). Após adição da solução de precipitação de proteína, agitação de 15 s no vórtex e centrifugação a 14.000 g por 4 minutos, o sobrenadante das duplicatas de cada amostra foram transferidos para um mesmo eppendorf contendo 400 µL de isopropanol, no lugar de 300 µL usados no protocolo 1 devido ao maior volume de sobrenadante transferido. Após a última etapa, o DNA foi reidratado em 20 µL de solução de rehidratação.

5.8. Controle de qualidade dos protocolos de lavagem e extração das amostras de colostro

A qualidade do material recuperado foi medida a partir de um espectrofotômetro (Thermo Fisher S120 NanoDrop Micro UV, Massachusetts, EUA), quanto à concentração, em ng/µl e ao índice de absorvância, pela relação A260/280. Além disso, foi realizado PCR convencional para o gene constitutivo GAPDH como controle endógeno da reação (**Tabela 6**).

Tabela 6: Sequência de nucleotídeos, alvo, tamanho do amplicon (pb) e referência utilizados em PCR para controle interno de extração de DNA de amostras de colostro bovino

Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Alvo	pb ¹	Referência
F – CCTTCATTGACCTCAACTACAT R - CCAAAGTTGTCATGGATGACC	GAPDH ²	400	Birkenheuer <i>et al.</i> (2003)

¹pb: Pares de bases;

²GAPDH: Gene constitutivo correspondente a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

A reação de PCR convencional foi realizada pela adição de 9 µL de mix contendo: 5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega, SP, Brazil), 3,6 µL de água nuclease-free e 0,4 µL do *primer*. A essa mistura, foi adicionado 1 µL de cada amostra. As condições do termociclador (Applied Biosystems Veriti 96-well 9902, Massachusetts, EUA) foram: desnaturação inicial - 5 min/95 °C, seguida por 35 ciclos compostos por desnaturação - 45 s/95 °C, anelamento - 45 s/58 °C e reação de extensão - 45 s/72 °C, e uma reação de extensão final - 5 min/72 °C (Birkenheuer *et al.*, 2003). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 %, corados com brometo de etídio e visualizados por transiluminação com luz UV (L-PIX, Epi-Light, Loccus Biotecnologia, SP, Brasil) em programa L-PIX Image, versão 2.7.

5.9. Testes moleculares para diagnóstico de hemopatógenos em amostras de sangue e colostro

As condições de termociclador para as amplificações de PCR e nPCR para *A. marginale* foram desnaturação inicial - 5 min/94 °C, seguida por 29 ciclos compostos por desnaturação - 1 min/92 °C, anelamento - 1 min/63 °C e reação de extensão - 1 min/72 °C, e reação de extensão final - 8 min/72 °C, adaptadas de Silveira *et al.* (2012) (**Tabela 7**). As condições de termociclador para as amplificações de PCR e nPCR para *B. bovis* e *B. bigemina* foram desnaturação inicial - 3 min/95 °C, seguida por 30 ciclos compostos por desnaturação - 30 s/95 °C, anelamento - 1 min/62 °C e reação de extensão - 30 s/72 °C, e reação de extensão final - 7

min/72 °C (Romero-Salas *et al.*, 2016). Para micoplasma hemotrópico, foi realizada PCR convencional. Neste caso, as condições de termociclador foram desnaturação inicial - 10 min/94 °C, seguida por 40 ciclos compostos por desnaturação - 30 s/95 °C, anelamento - 30 s/60 °C e reação de extensão - 30 s/72 °C, e reação de extensão final - 7 min/72 °C (Criado-Fornelio *et al.*, 2003).

Tabela 7: Técnica de diagnóstico molecular, sequência de iniciadores, alvo molecular e referências utilizadas para diagnóstico de *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *B. bigemina* e micoplasmas hemotrópicos em amostras de DNA provenientes de sangue e colostro bovino

Hemopatógeno	Técnica	Sequência nucleotídeos	Alvo	Amp ¹	Referência
<i>Anaplasma marginale</i>	PCR	GGGAGCTCCTATGAATT	Msp4 ²	872	de la
		ACAGAGAATTGTTTAC			Fuente <i>et</i>
		CCGGATCCTTAGCTGAA			<i>al.</i> (2008)
		CAGGAATCTTGC			
<i>Babesia bovis</i>	nPCR	CGCCAGCAAACCTTTTCC	Msp4	294	Silveira <i>et</i>
		AAA			<i>al.</i> (2012)
		ATATGGGGACACAGGC			
		AAAT			
<i>Babesia bovis</i>	PCR	TGAACAAAGCAGGTAT		260	Romero-
		CATAGG			Salas <i>et al.</i>
		CCAAGGAGATTGTGAT			(2016)
		AATTCA			

		TCCACGATCTGTGATAC	Acitb ³		Romero-
		GTCA			Salas <i>et al.</i>
nPCR		CAAATCCTTTGCAAACCT		195	(2016)
		CCAA			
		TCCAACACCAAATCCTC			Romero-
		CTA	Acitb		Salas <i>et al.</i>
PCR		CGTGGGTTTCGTTTTTG		394	(2016)
		TAT			
<i>B. bigemina</i>		AAGAGATACCATATCA			Romero-
		GGGAACCA			Salas <i>et al.</i>
nPCR		TTGGGCACTTCGTTATT		250	(2016)
		TCC			
		ATACGGCCCATATTCCT	16S		Criado-
Micoplasma		ACG	rRNA		Fornelio <i>et</i>
hemotrópico	PCR	TGCTCCACCACTTGTTTC		~595	<i>al.</i> (2003)
		A			

¹Amp: Tamanho do amplicons, em pares de bases (pb);

²Msp4: Major surface protein - proteínas principais de membrana, tipo 4;

³Acitb: Apocitocromo b.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese (Bio-Rad) em gel de agarose a 1 % para *A. marginale* e micoplasmas hemotrópicos, e gel de agarose a 1,8 % para *B. bovis* e *B. bigemina*, corados com brometo de etídio e visualizados por transiluminação com luz UV (L-PIX, Epi-Light, Loccus Biotecnologia, SP, Brasil) em programa L-PIX Image, versão 2.7.

5.10. Análise estatística

As análises do capítulo 1 foram realizadas no programa RStudio® versão 4.2.1. Procedeu-se análise descritiva não paramétrica dos parâmetros de qualidade ng/μL e razão de pureza A260/280 para o estudo de comparação entre os protocolos de processamento e extração de DNA, após aplicação dos testes de normalidade e homocedasticidade (Shapiro-Wilkins e Levene, respectivamente) com posterior comparação de medianas pelo teste de Wilcoxon, devido à distribuição não normal e não homogênea dos dados.

A análise descritiva dos dados relacionados à pesquisa de hemopatógenos em amostras de sangue e colostro foi realizada em Excel® (versão 2019), e foi representada por: percentual de animais positivos e negativos para: *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina*, e micoplasmas hemotrópicos, em sangue e colostro; e percentual de coinfeções.

6. CAPÍTULO I

Evaluation of DNA extraction from thawed bovine colostrum

Mayara Campos Lombardi^{1*}, Júlia Angélica Gonçalves da Silveira², Camila de Valgas e Bastos Castro², Sandra Gesteira Coelho³, Tiago Facury Moreira¹, Rodrigo Melo Meneses¹, Antônio Último de Carvalho¹, Elias Jorge Facury Filho^{1&}

¹ Department of Animal Science, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 30161-970

²Department of Medicina Preventive Veterinary Medicine, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 30161-970

³Department of Dairy Science, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 30161-970

ABSTRACT

Protection and nutrients of bovine colostrum are essential for the bovine newborn. However, attention should be paid to the possibility of disease transmission via colostrum, as the identification of pathogens, such as viruses and bacteria, has already been reported. Compared to milk, there have been few studies investigating pathogens in bovine colostrum. Although found in the scientific literature, the DNA extraction techniques applied to bovine colostrum were not standardized, since there is no specific commercial reagent for this biological material, and the protocols need to be adapted. The objective of the present study was to performed DNA extraction from thawed bovine colostrum. For this purpose, 76 colostrum samples from different cows were aseptically collected, consisting of 10 mL from each mammary quarter, and immediatly frozen. The samples were clarified and washed with physiological saline NaCl

0.9 % (P1) or 1x phosphate buffered saline (1X PBS, P2), and only then passed through the protocol adapted from the one used for blood extraction recommended by the manufacturer of the commercial kit used. The protein concentration (ng/ μ L) and the A260/280 purity ratio were measured on a spectrophotometer, and PCR to detect the constitutive gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were performed to assess the effectiveness of the techniques. The DNA concentration was greater for P2 (10.34 ± 14.03 ng/ μ L vs. 67.03 ± 81.64 ng/ μ L), while the median of A260/280 were 1.67 and 1.80, for protocols 1 and 2, respectively. Only 6.25 % of the samples were positive for GAPDH in protocol 1, while 100 % were positive in protocol 2. Protocol 2 proved to be more efficient for processing colostrum samples.

Key words: cell lysis, colostrum processing, fresh or frozen sample, nuclei lysis, standardization technique of DNA extraction

6.1 INTRODUCTION

The bovine colostrum is a first secretion of mammary gland, and its relevance for calves is consensus in world literature (Godden, 2008; Lombard *et al.*, 2020). Besides the importance for passive immunity and local protection in intestine, bovine colostrum is a main source of a variety of bioactive components, such as nutrients, hormones, and antimicrobial factors (Godden *et al.*, 2019; Van Soest *et al.*, 2022). Similar reasoning applies to transitional milk, which plays a fundamental role in the development and protection of the newborn (Van Soest *et al.*, 2020; Kargar *et al.*, 2021; Van Soest *et al.*, 2022).

In this context, the presence of pathogens in bovine colostrum has been reported by some authors, such as *Neospora caninum* (Moskwa *et al.*, 2007), *Salmonella* sp. (Houser *et al.*, 2008), *Listeria monocytogenes* (Agostini *et al.*, 2012), *Mycoplasma bovis* (Gille *et al.* 2020), and bovine leukosis virus (Úsuga-Monroy *et al.*, 2021), and may contribute to the vertical transmission of these agents. Nevertheless, colostrum pasteurization has been reported as an

important measure in the sanitary management of newborn dairy calves (Elizondo-Salazar and Heinrichs, 2009; Armengol and Fraile, 2016), although it cannot be applied to beef calves. Even so, there are not as many studies focused on investigating pathogens and its behavior in bovine colostrum, unlike what happens with research on pathogens in bovine milk.

In ruminant milk, with or without mastitis, the presence of several pathogens, such as bovine viral diarrhea virus (Drew *et al.*, 1999), bovine leukemia virus (Kuckleburg *et al.*, 2003), *Anaplasma ovis*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum* (Zhang *et al.*, 2016), and *A. marginale* has already been reported (Dela Cruz *et al.*, 2019).

Given to the role of bovine colostrum, part of the reason for the scarcity of studies seems to be associated with the lack of standardization of methods to obtain analytical material from colostrum samples, such as procedures to remove the fat layer, and DNA extraction (Lipkin *et al.*, 1998; Caldart *et al.*, 2011; González *et al.*, 2013; Dela Cruz *et al.*, 2019). The variety and high proportion of components in bovine colostrum (Azevedo *et al.*, 2023; Feng *et al.*, 2023) can reduce the success rate of microbiological analyses and diagnostic tests, such as culture and isolation, making molecular diagnosis an interesting alternative tool for studying the microbiome and pathogens in this material, despite its limitations.

Studies and literature reviews have demonstrated various functionalities of bovine colostrum in other animal species and humans (Gosh and Iacucci, 2021; Sangild *et al.*, 2021; Yasir *et al.*, 2024). The development of more suitable reagents and processing techniques for bovine colostrum molecular diagnosis may be necessary to add quality and accuracy to the analyses and increase our understanding in many areas.

The objective of this study was to perform and compare two methods of processing bovine colostrum for subsequent DNA extraction.

6.2 MATERIAL AND METHODS

The present study is part of a research to molecularly investigate hemopathogens in bovine colostrum. All procedures used in this experiment were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation at the Universidade Federal de Minas Gerais CEUA/UFMG (222/2022). The owner or representative was informed and signed an informed consent form regarding the necessary collections for the study.

6.2.1 Cows, and colostrum samples

The 76 sample of bovine colostrum were collected on a commercial dairy Holstein herd (-21.722899675089153, -45.163023077254586, South of Minas Gerais, Brazil). Colostrum milking of cows occurred twice a day, at 08 00 and 16 00. Two researchers were trained to carry out the collections, according to Hogan *et al.* (1999). In accordance to the farm management, the total colostrum volume from each cow was directed to the same barrel. Therefore, sample were carried out immediately after pre-dipping and drying the teats of each cow.

The colostrum sample from each cow consisted of 10 mL of manually colostrum milking from each mammary quarter, totaling 40 mL/cow, stored in a sterile 50 mL Falcon tube. None of the cows were diagnosed with clinical mastitis. Immediately after collection, the tube was sealed, labeled, and frozen at -20 °C. All analyzes and protocol development were carried out in the Veterinary Protozoology Laboratory (ProtoVet, Escola de Veterinária UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil). In order to minimize the risk of sample contamination, and given the colostrum milking management, it was not possible to measure the Brix of the samples fresh. Thus, the Brix was assessed using a digital refractometer (MISCO DD-3, MISCO, USA) at the time of sample thawing for processing.

6.2.2 Colostrum processing - washing

After carefully evaluation, the colostrum extraction technique to obtained DNA was adapted from different protocols for bovine colostrum and milk in the literature (Lipkin *et al.*, 1998; Caldart *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2013; Úsuga-Monroy *et al.*, 2021; Gomes *et al.*, 2024), since a method considered standard for bovine colostrum samples was not found. In all studies consulted, remove fat layer was adopted as the first step in processing, performed of different forms, except in Caldart *et al.*, 2011. In general, washing was performed with the addition of saline and centrifugation techniques. Thus, the present study compared two protocols to wash the bovine colostrum sample, where: protocol 1 (**P1**) was performed with saline solution NaCl 0.9 % (Physiological 0.9 %, Equiplex, Aparecida de Goiânia, GO, Brazil), and the protocol 2 (**P2**) was performed with 1X phosphate buffered saline (1X **PBS**).

To obtain 1X PBS was prepared and sterilized 500 mL of 10X PBS. To adjust the pH (7.0) of the solution, 6 mL of NaOH (1N) was added. The final volume was distributed in two bottles (250 mL). Sterilization of the 10X solution was carried out at 121 °C for 20 min. The 10x PBS was diluted to 1X PBS in a laminar flow hood, in which 5 mL of 10X PBS was added to 45 mL of distilled water as needed to perform the colostrum washing. Subsequently, DNA extraction was performed in two samples to test the solution quality.

The protocols mainly differed in terms of the volume of colostrum (7 mL *vs.* 14 mL), type of the saline solution (Physiological Solution NaCl 0.9 % *vs.* 1X PBS), temperature of centrifugation (25 °C *vs.* 5 °C; 3,500 rpm), centrifugation time, and number of washing (**Table 1**).

Table 1. Steps of two protocols (1 – commercial Physiological Solution 0.9 %, and 2 – 1X PBS - phosphate buffered saline, in duplicate) used to prepare bovine colostrum samples for subsequent DNA extraction.

Steps	P1 ¹	P2 ²
1	Add 7 mL of physiological solution plus 7 mL of colostrum to sterile falcon tube (15 mL)	Add 7 mL of 1X PBS plus 7 mL of colostrum to sterile falcon tube (15 mL)
2	Centrifuge at 25 °C for 15 min	Centrifuge at 5 °C for 20 min
3	Refrigerate at 4 – 8 °C for 30 min	Refrigerate at 4 – 8 °C for 30 min
4	Carefully remove the fat layer ³	Carefully remove the fat layer
5	Pour the tube and discard the supernatant	Pour the tube and discard the supernatant
6	Vortex vigorously until the pellet is resuspended ⁴	Vortex vigorously until the pellet is resuspended
7	Add 10 mL of physiological solution	Add 7 mL of 1X PBS
8	Homogenize and centrifuge at 25 °C for 5 min	Homogenize and centrifuge at 5 °C for 8 min
9	Pour the tube and discard the supernatant	Pour the tube and discard the supernatant
10	Resuspend the pellet in 10 mL of physiological solution	If the mixture is still cloudy, repeat steps 7 to 9
11	Homogenize and centrifuge at 25 °C for 5 min	Resuspend the pellet in 4 mL of 1X PBS
12	Pour the tube and discard the supernatant	Store at -20 °C

13 Ressuspend the pellet in 5 mL of
 physiological solution

14 Store at -20 °C

¹P1: Protocol 1, performed with physiological solution (0.9 %), and centrifuged at 25 °C;

²P2: Protocol 2, performed in duplicate with 1X25 °C PBS, and centrifuged at 5 °C;

³Carefully remove fat layer: The density of the fat layer was varied, so that for very thin layers, manual removal was not necessary. To manually remove the fat layer, a sterile 1000 µL tip was used.;

⁴Vortex vigorously until the pellet is resuspended: In some cases, the pellet formed from bovine colostrum was firm, and required a different time for resuspension, ranging from 30 to 180 s.

All the supernatant was removed by inverting the tubes in a single motion. After the final resuspension the washed samples were aliquoted and stored at -20 °C in sterile tubes (2 mL). The remaining whole colostrum were stored at -20 °C in sterile Falcon tubes (15 mL).

6.2.3 Colostrum processing - DNA extraction

The DNA extraction process using a commercial kit Wizard® Genomic DNA Purification from Promega (São Paulo, Brazil) was performed in accordance to the manufacturer's instructions for the samples from P1. The samples were thawed at 25 °C, and subsequently homogenized and transferred (300 µL) to sterile tubes (1.5 mL) containing 900 µL of Cell Lysis Solution.

For the P2 it was applied some modifications. The procedure of DNA extraction was performed with the same commercial kit, however, in duplicate, as in the washing process described. Only after the addition of the protein precipitation solution, shaking for 15 s on a vortex mixer, and centrifugation at 14,000 g - 4 minutes, the supernatant from the duplicates

of each sample was transferred to the same tube (1.5 mL) containing 400 μ L of isopropanol, instead of the 300 μ L used in P1 due to the larger volume of supernatant transferred. After the final step, the DNA was rehydrated in 20 μ L of rehydration solution, while in the P1 the rehydration was performed with 40 μ L of the same solution.

The remaining washed colostrum from each sample was stored at -20°C in sterile tubes (2 mL).

6.2.4 Quality of the DNA extraction

The quality of the recovered material by P1 and P2 was evaluated using a spectrophotometer (Thermo Fisher S120 NanoDrop Micro UV, Massachusetts, EUA) for measurement to the DNA concentration ($\text{ng}/\mu\text{L}$) and absorbance through the A260/280 purity ratio. Additionally, conventional PCR was performed for the constitutive gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) to detecting PCR inhibitors (Birkenheuer *et al.*, 2003).

Conventional PCR reaction was carried out by adding 9 μ L of a mix containing: 5 μ L of GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega), 3.6 μ L of nuclease-free water, and 0.4 μ L of primer (**Table 2**). To this mixture, 1 μ L of each sample was added. The conditions of the thermocycler (Applied Biosystems Veriti 96-well 9902, Massachusetts, USA) were adjusted according to Birkenheuer *et al.* (2003).

Table 2. Primer, sequence of nucleotide, target gene, amplicon size, and reference to perform Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect PCR inhibitors in the colostrum sample after the DNA extraction.

Primer	Sequence	TG ¹	AS ²	Reference
GAPDH-F	CCTTCATTGACCTCAACTACAT			Birkenheuer
GAPDH-R	CCAAAGTTGTCATGGATGACC	GAPDH	400 bp	<i>et al.</i> , 2003

¹TG: Target gene;

²AS: Amplicon size.

6.2.5 Statistical analysis

All analyses were conducted using RStudio® version 4.2.1. A non-parametric descriptive analysis of the quality parameters ng/μL and A260/280 purity ratio was performed to compare DNA processing and extraction protocols. This involved applying tests for normality and homoscedasticity (Shapiro-Wilk and Levene, respectively), followed by comparison of medians using the Wilcoxon test due to the non-normal and non-homogeneous distribution of the data, with a confidence level of 0.95 and significance $P \leq 0.05$.

6.3 RESULTS AND DISCUSSION

The quality of the processing product was markedly different between the methods applied, and greater results were observed for the P2 (**Table 3**). The average DNA concentration was 10.34 ± 5.07 ng/μL and 67.03 ± 2.00 ng/μL ($P < 0.05$) for P1 and P2, respectively, while the median of A260/280 purity ratio was 1.66 and 1.80. In the present study, 6.25% of samples were positive for GAPDH in P1, whereas all of samples were positive in the

P2, demonstrating that this protocol allowed higher capacity of preservation the biological components in colostrum samples and absence of inhibitors of PCR (Birkenheuer *et al.*, 2003).

Table 3. Descriptive analysis of quality parameters evaluated in two protocols of wash and DNA extraction of bovine colostrum samples.

Parameter	Protocol 1*		Protocol 2**	
	ng/ μ L	A260/280	ng/ μ L	A260/280
Mean	10.34	2.18	67.04	1.77
SE ¹	6.01	0.64	15.41	0.04
q1 ²	0.3	0.87	7.92	1.66
q3 ³	5.75	2.03	42.2	1.89
Median	1.95	1.67	15.6	1.80
Minimum	-0.8	-3.6	1.2	0.66
Maximum	456.9	45.3	635.9	2.91

*Protocol 1: Performed with physiological solution (0.9 % NaCl), and three steps of wash;

**Protocol 2: Performed in duplicate with 1X PBS, and two steps of wash;

¹SE: Standard error;

²q1: First quartile;

³q3: Third quartile.

The average Brix value of the samples was 28.4 ± 0.16 (mean \pm coefficient of variation - CV), with the most frequent value being 27.3 for three samples. The median was 27.5, with

maximum and minimum Brix values of 39.2 and 18.9, respectively. The Brix refractometry is highly correlated with the total solids of milk and colostrum, and it is considered an efficient and practical tool for estimating the concentration of immunoglobulin G in bovine colostrum (Quigley *et al.*, 2013; Floren *et al.*, 2016). Morrill *et al.* (2015) demonstrated that there was no significant effect of freezing cycles on Brix refractometer readings. Thus, the Brix values of the samples processed in the present study mostly showed high estimates for total solids and IgG. Considering that the presence of fat, proteins, minerals, and others can act as inhibitory factors for PCR (Wilson, 1997), measuring quality parameters and standardization techniques is essential to support molecular tests using this material.

The quality parameters measured by spectrophotometer are widely used for assessing the quality of DNA samples, including in molecular studies on bovine colostrum. Unfortunately, not all studies have reported internal control results. Generally, A260/280 purity ratio are considered good when around 1.8-2.0, although the interval between 1.6 and 2.0 can be considered satisfactory (Mahuku, 2004). In the P2 of the present study, 46 out of 76 samples met between 1.8-2.0 in P2. In addition, the values of 1.66 and 1.89 for the first and third quartile, respectively, and median of 1.80 helped to demonstrate the lower variation and the most appropriated values.

It is known that the composition of whole bovine milk differs significantly from that found in colostrum and transitional milk (Georgiev, 2008). In this regard, one could suppose the presence of fewer inhibition factors and losses during sample washing and processing for milk. On the other hand, the yield of available and recovered DNA may be lower, as evidenced in a study by Quigley *et al.* (2012) that evaluated seven DNA extraction protocols in milk and cheese. The results demonstrated numerically higher DNA concentration in cheese samples, considering the protocol that obtained the best results for the A260/280 purity ratio. In this study, fresh samples were used, and the heat treatment of the milk at 70 °C/10 minutes followed

by 10 minutes of vortexing increased the yield of recovered DNA by approximately 3.87 times (Quigley *et al.*, 2012). Whereas, the additional use of ethanol for protein precipitation had a negative effect on this parameter, and the application of additional steps to the protocols was more beneficial for milk than cheese.

In the present study, no heat treatment of the samples was performed, and vortexing times did not exceed 180 s. It is worth noting that thawed samples were used in this study, where it is expected that a large portion of the cells present in the colostrum would be disrupted during thawing. We believe that the longer centrifugation time and the centrifugation temperature (5 °C) of P2 contributed to the sedimentation of DNA and reduction of losses in the supernatant during the wash.

Many studies that assessed A260/280 found values further from the ideal range and evaluated fewer samples. Given the variation in composition that can be found in colostrum, the sample size may have been a limiting factor. In the present study, samples were processed in rounds with a maximum of 10 samples at a time, due to the labor and time involved in each protocol. Within the same round, both DNA concentration and A260/280 purity ratio showed samples with both ideal and poor results. This suggests that intrinsic characteristics of each sample may contribute significantly to the success of the processing.

Peres *et al.* (2010) reported a possible interference of other microorganism species on the multiplication of *L. monocytogenes*, which could have negatively influenced its detection by PCR technique in inoculated milk samples. We believe that in the present study, this may not have been a determining factor for the quality of the extracted material, since the colostrum samples were immediately frozen after collection, and thawing would likely have caused bacterial cell rupture, besides having remained open for the strictly necessary time to be transferred to new tubes, with immediate onset of washing steps. However, in the present study was not conducted evaluations regarding the microbiological quality of samples.

Caldart *et al.* (2011) obtained purity ratios ranging from 0.86 to 1.62 for four DNA extraction protocols in samples of ruminant milk, with observed statistical differences, while for blood samples, the ratios ranged from 0.91 to 1.88. On the other hand, the lower presence of PCR inhibitors in blood samples, for example, contributes to purity ratios within the range considered ideal. Lee *et al.* (2010) compared three DNA extraction methods and obtained A260/280 between 1.56 and 2.04, with average of 1.84 ± 0.09 , 1.88 ± 0.08 , and 1.70 ± 0.08 for the different methods. The DNA concentration ranged from 9.59 to 52.85 ng/ μ L, and all protocols were considered good based on these parameters by these authors.

The main functions of GAPDH related to cellular metabolism (Tristan *et al.*, 2011) include activity in glycolysis, gene expression regulation, and apoptosis. Therefore, it is present in a wide variety of species, cell types, and structures, such as the cytoplasm, vesicles, mitochondria, and nucleus (Tristan *et al.*, 2011). Although amino acid sequence alterations may occur, given its essential role in cellular metabolism, the structure of GAPDH tends to be highly conserved. These makes it a good marker for internal control in sample processing (Nicholls *et al.*, 2012).

However, other genes are also commonly used for this purpose, such as the actin gene (Dela Cruz *et al.*, 2019). Although steps of the sample washing process were modified in the present study, we believe that a significant portion of the improvement in the quality of the material obtained with P2 is due to the use of 1X PBS instead of 0.9 % NaCl saline solution. Presumably, the use of the buffer provided a more suitable medium for the sample constituents and facilitated the removal of PCR inhibitors without significantly compromising the DNA present in the samples.

Thus, the presence of GAPDH would be expected since the rich diversity of cellular components described in bovine colostrum, such as neutrophils, macrophages, lymphocytes (Lee *et al.*, 1980; McGrath *et al.*, 2016), and the epithelial glandular cells themselves.

Furthermore, the existence of microbiota in this secretion is known, along with the possibility of pathogen carriage. In a recent study on the microbiota of bovine colostrum, Yasir *et al.* (2024) reported a high diversity of microorganisms, of which approximately 90% were represented by bacteria, including pathogenic and non-pathogenic ones. Additionally, in the present study, hygienic and disinfection measures were adopted to reduce the risks of contamination in colostrum samples. Since the aim of this standardization was to perform further investigation of pathogens in bovine colostrum, we believe that the recovered DNA is indeed representative of the real composition of the sampled colostrum.

Gille *et al.* (2020) collected 368 pooled bovine colostrum samples in a 15 mL Falcon tube. Internal control parameters were not reported; however, the authors were able to identify the presence of the researched agent in 1.9% of the samples. Dela Cruz *et al.* (2019) collected 5 mL of bovine milk sample for DNA extraction and PCR. The internal control was performed by PCR for the actin gene and all 98 sample were positive. The DNA extraction was performed using a commercial kit of different reagents from those used in the present study; however, sample washing was also conducted with PBS.

The physiological saline solution (NaCl 0.9 %) proved not to be a good option for performing the colostrum washing. In the present study, the use of 1X PBS for washing colostrum samples, combined with other protocol adaptations were more suitable for obtaining DNA samples of better quality. Given the growing recognition of the role of bovine colostrum in calf rearing and in the health of other species, including humans, we believe it is necessary to develop specific reagents and protocols tailored to different types of bovine colostrum processing.

We emphasize the importance of developing specific reagents that can provide even greater accuracy and lower variation in DNA concentration and purity ratio, which may have been influenced by the diversity of components in this type of biological material. Even so, it

is recommended to carry out DNA extraction in duplicate to increase the possibility of recovering the genetic material in the samples.

6.4 CONCLUSIONS

In the present study, the protocol with 1X PBS to wash and remove the fat layer in bovine colostrum proved to be better than the physiological solution (NaCl 0.9 %). In addition to the saline solution, the larger volume of colostrum used in P2 and the rehydration in a smaller volume of rehydration solution at the end of DNA extraction resulted in samples with higher DNA concentration and better A260/280 purity ratio. The presence of GAPDH in all DNA samples obtained from P2 confirms the viability of this protocol.

7. CAPÍTULO II

Molecular detection of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and hemotropic *Mycoplasma* in bovine colostrum

Mayara Campos Lombardi^{1*}, Júlia Angélica Gonçalves da Silveira², Nicolas Colácio², Camila de Valgas e Bastos Castro², Sandra Gesteira Coelho³, Tiago Facury Moreira¹, Rodrigo Melo Meneses¹, Antônio Último de Carvalho¹, Elias Jorge Facury Filho^{1&}

¹Department of Animal Science, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 30161-970

²Department of Medicina Preventive Veterinary Medicine, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 30161-970

³Department of Dairy Science, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 30161-970

ABSTRACT

Bovine colostrum (BC) plays a fundamental role in the nutrition and protection of newborn calves, although it may also contain pathogens that pose health risks. Research on pathogens in colostrum is still limited and focuses on a few viral and bacterial agents. The aim of this study was to investigate the hemopathogens *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *B. bigemina*, hemotropic *Mycoplasma* spp. (HM) in BC by molecular investigation. Aseptically collected blood and BC were obtained from 104 cows in a commercial dairy herd in southern

Minas Gerais, Brazil. The BC were collected immediately after pre-milking management, consisting of 10 mL from each mammary quarter. Whole blood samples (5 mL) were collected by venopuncture of coccygeal vein. The DNA extraction was performed, followed by molecular diagnostic application using PCR techniques. Blood analyses revealed the frequencies of 95.19 % (99/104) for *A. marginale*, 52.88 % (55/104) for *B. bovis*, 62.5 % (65/104) for *B. bigemina*, and 74.85 % (82/104) for HM. The investigation in BC showed that at least one of the agents was present in 22.12 % of the samples, with frequencies of 12.12 % (12/99) for *A. marginale*, 10.91 % (6/55) for *B. bovis*, and 6.1 % (5/82) for HM. The presence of DNA can not confirm its viability or the potential for infecting calves. In our knowledge, this is the first study to report the presence of these hemopathogens related to bovine parasitic sadness in colostrum from naturally infected cows. These findings demonstrate the need for further investigation into the viability of the microorganisms and their epidemiological role, once the vertical transmission can be an important route for some pathogens. Furthermore, it highlights the relevance of managements for control of the hemopathogens.

Key words: cattle tick fever, hemopathogens, mammary gland, molecular diagnosis, vertical transmission

7.1 INTRODUCTION

In the last decades, its role on calf immunity and development has been widely studied, including the knowledge about the colostrum microbiome (Godden, 2008; Godden *et al.*, 2019; Lombard *et al.*, 2020; Uyama *et al.*, 2022). Given the role of bovine colostrum (**BC**), the fact that there are relatively few studies on pathogens in BC contrasts with the increasing attention given to this rich and important product of the mammary gland in rearing calves. Some of these

studies were able to demonstrate the role of BC as a vertical transmission route for the identified pathogen, such as the bovine leukosis virus (Hopkins and DiGiacomo, 1997), and *Mycoplasma bovis* (Gille *et al.*, 2020).

Through the variety of microorganisms that can use the hematogenous route, the identification of another pathogenic agents in BC can provide essential information for herd health management. Especially for the tropical and subtropical regions, the tick-borne diseases as the bovine parasitic sadness (**BPS**) are responsible for substantial losses, both to beef and dairy cattle herds (Kocan *et al.*, 2010; Mosqueda *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2023). Some of the major hemopathogens are the rickettsia *Anaplasma marginale*, and the protozoa *Babesia bovis* and *B. bigemina* (Souza *et al.*, 2021). In addition, the hemotropic *Mycoplasma* spp. (**HM**) as the *Mycoplasma weyonii* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ have been reported in diverse frequencies around the world (Niethammer *et al.*, 2018; de Mello *et al.*, 2019). Although many of the positive animals for HM have been reported as apparently healthy, the role of these agents and their impacts are still poorly understood (de Souza and Ruegg, 2023). It is noteworthy that co-infections with agents of BPS are also being reported (Giroto *et al.*, 2012; Giroto *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2024). The increase of diagnosis of HM infection in the herds draws attention to study and greater understanding of the role of this agent.

The transmission of hemopathogens is closely associated with the presence of mechanical and biological vectors, such as ticks and hematophagous flies (Aubry and Gaelle, 2011; Hornok *et al.*, 2011; Mosqueda *et al.*, 2012). However, the increasing intensification of production systems has progressively reduced the contact between animals and these vectors. In this context, vertical transmission may play an essential role in maintaining these pathogens within the herd (Mendonça *et al.*, 2022). Transplacental transmission has been previously reported for these hemopathogens, demonstrating their ability to cross uterine barriers (Costa

et al., 2016; Giroto *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2024). Given that *A. marginale* and *B. bovis* have been associated with lesions in fetuses, stillbirths, and neonatal death, there is sufficient evidence to believe that the tick fever agents are viable in the maternal circulation, even if pregnant cows do not show clinical signs (Henker *et al.*, 2020; Andrade *et al.*, 2024). On the other hand, although detected in fetuses, HM has not yet been associated with lesions responsible for abortion, and its effects are not fully understood.

Recently, Zhang *et al.* (2016) and Dela Cruz *et al.* (2019) identified DNA from different species of *Anaplasma* in milk of small ruminants and cattle, respectively. However, there seem to be no subsequent publications in the general literature that have conducted investigations to elucidate these findings, such as the possibility of viability and transmission. More recently, Bezerra *et al.* (2023) demonstrated the detection of *Trypanosoma vivax* DNA in colostrum from goats experimentally infected in the last trimester of gestation. Considering the mechanisms of colostrogenesis, many components and cell types can pass from the blood to the colostrum (Baumrucker *et al.*, 2021). Thus, we hypothesized that DNA from *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina*, and HM could be identified in colostrum from naturally infected cows carrying these agents.

The objective of this study was to investigate the presence of *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina*, and hemotropic *Mycoplasma* spp. in bovine colostrum of naturally infected cows.

7.2 MATERIALS AND METHODS

All procedures used in this experiment were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation at the Universidade Federal de Minas Gerais CEUA/UFMG (222/2022). The samples were collected in a commercial dairy farm in southern of Minas

Gerais, Brazil (-21.722899675089153, -45.163023077254586), a region of a tropical high-altitude climate. The owner was briefed and received and signed an informed consent form regarding the necessary collections for the study.

7.2.1 Sample size

The sample size was determined by the estimated proportion of animals positive for *A. marginale* (0-100 %), according to a methodology based on the binomial distribution. The population universe of adult females to be sampled was 1,300 individuals, so the estimation was made considering an infinitely large population. Using an estimate obtained from the historical and sanitary control of anaplasmosis on the farm, and assuming an occurrence of 11 % of colostrum samples positive for *A. marginale*, based on prevalence of this agent in transplacental transmission found in earlier studies from the present research group (Silvestre *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2024), the sample size of 104 was defined to encompass an interval between 5 and 6 % for the margin of error.

7.2.2 Cows and management

The dairy farm was selected due the history of BPS treatments. Minimum and maximum temperatures ranged from 16 to 23 °C, with monthly precipitation between 13 and 39 mm (April to July; Weather Spark). With a herd of just over 1300 Holstein lactating cows and an average daily production of 50,000 L, the animals were raised in different systems: calf rearing in suspended cages; confined rearing system in a barn with access to paddocks; free-

stall system with sand bedding, ventilation, and sprinklers for heifers, cows in pre-calving, and lactating cows; and paddocks for dry cows and pregnant heifers with feeding lanes.

Immediately after birth, calves received their first umbilical cord treatment with 10 % iodine solution and were transferred to a covered calf pen with suspended cages, where they were individually raised until 60 days of age. Calves were thawed colostrum-fed with a volume corresponding to at least 10 % of their body weight immediately upon arrival at the calf pen, with a minimum brix of 25 %. Subsequently, animals were fed with discard milk, high-granularity concentrated feed, and water. Between 60 and 240 days of age, animals underwent BPS prevention management in a handling center located in the same barn where they were housed. These animals were divided in groups based on body weight, with initial groups having restricted access to paddocks, while intermediate and final groups had free access. The location had been used for many years and had a recognized history of tick infestation. The BPS management was carried out three times a week, alternating groups so that all animals were assessed at least once a week.

Those animals with rectal temperatures above 39.4 °C were treated with oxytetracycline and imidocarb dipropionate, according to weight measured by weighing tape and manufacturer recommendations. Approximately 30 % of the animals were treated at each assessment, so that approximately 100 % of the animals will have been treated for BPS at least once before reaching 12 months of age. There was no reported history of BPS or treatment for these in post-rearing animals, including the lactating and dry cows. On average, at 240 days of age the heifers were transferred to barns, where they remained until confirmation of pregnancy. Pregnant heifers were moved to paddocks, where they joined dry pregnant cows.

Tick control was carried out using pour-on application or dipping, with products indicated for each animal category, based on the detection of high infestation load by visual

observation. No specific criteria or intervals were used. Fly control was achieved through the use of traps and daily spraying of product on surfaces such as walls in the milking parlor.

In the prepartum, cows were conducted to a free-stall, with sand beds, sprinkler and forced ventilation. The animals were fed with a total mixed ratio, and the signs of labor were monitored 24 h. After the start of labor, the cows were taken to a maternity pen with a hay bed, adjacent to the free-stall. At birth, the calves were immediately removed from the dams. Colostrum milking occurred twice a day (08 00 and 16 00). The postpartum management consisted of the clinical mastitis test, pre-dipping, colostrum milking, and post-dipping.

7.2.3 Blood sample and DNA extraction

The 104 blood samples were collected in a vacum tube with EDTA (5 mL), from coccygeal vein after the colostrum milking. For this purpose, the collection site was cleaned with paper towels to remove excess organic matter, and disinfected with 70 ° alcohol. The samples were frozen and transported refrigerated to the laboratory. All analyzes and protocol development were carried out in the Veterinary Protozoology Laboratory (ProtoVet, Escola de Veterinária UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil). The protocol for DNA extraction was performed from 300 µl of sample according to the manufacturer's instructions (Wizard® Genomic DNA Purification, Promega, SP, Brazil).

7.2.4 Colostrum samples and DNA extraction

All pre and postpartum management was carried out by the property's collaborators, following the routine. Individual colostrum collection was conducted simultaneously by two trained researchers. The 104 colostrum samples were obtained aseptically by manually expressed of 10 mL from each mammary quarter, totaling 40 mL, stored, and frozen in a sterile 50 mL Falcon tube. Immediately after pre-dipping and drying, the teats were disinfected with 70 ° alcohol for collection according to Hogan *et al.* (1999). Immediately after collection, the tube was closed, labeled, and frozen at -20 °C. Only one sample showed discoloration suggestive of the presence of blood, with no visible signs of other changes in the milk or udder. All analyzes and protocol development were carried out in the Veterinary Protozoology Laboratory (ProtoVet, Escola de Veterinária UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil). Colostrum samples were washed with 1X PBS according to Protocol 2, as described in Chapter 1. After the wash, the DNA extraction was performed in duplicate, with the same reagents described for blood extraction (Capítulo I).

7.2.5 Molecular diagnosis

All samples of colostrum were tested for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, according to Birkenheuer *et al.* (2003) and had positive result, confirmig the absense of PCR inhibitors. The molecular diagnosis of hemopathogens was carried out by nPCR for the *A. marginale*, *B. bovis*, and *B. bigemina*, and by conventional PCR for the HM in thermocycler (Applied Biosystems Veriti 96-well 9902, Massachusetts, USA). The reactions were performed with 5 µL of GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega, SP, Brazil), 3.6 µL of mili-Q water, and 0.4 µL of specific primers (**Table 1**). After mix prepare and its distribution in sterile microtubes (0.2 µL), 1 µL of DNA extracted from each sample was added, totalizing 10 µL.

Table 1. Assay, primer sequence, target, amplicon size, and reference for *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *B. bigemina*, and hemotropic *Mycoplasma* for molecular diagnosis in blood and colostrum of dairy cows.

Hemopathogen	Assay	Primer sequences	Target	Amplicon size	Reference
<i>A. marginale</i>	PCR	GGGAGCTCCTATGAAT	Msp4	872	de la Fuente <i>et al.</i> (2008)
		TACAGAGAATTGTTTA			
		C			
	nPCR	CCGGATCCTTAGCTGA	Msp4	294	Silveira <i>et al.</i> (2012)
		ACAGGAATCTTGC			
		CGCCAGCAAACCTTTTC			
<i>B. bovis</i>	PCR	CAAA	Acytb ¹	260	Romero-Salas <i>et al.</i> (2016)
		ATATGGGGACACAGGC			
	nPCR	AAAT	Acytb ¹	195	Romero-Salas <i>et al.</i> (2016)
		TGAACAAAGCAGGTAT			
<i>B. bovis</i>	PCR	CATAGG	Acytb ¹	260	Romero-Salas <i>et al.</i> (2016)
		CCAAGGAGATTGTGAT			
	nPCR	AATTCA	Acytb ¹	195	Romero-Salas <i>et al.</i> (2016)
TCCACGATCTGTGATA					
<i>B. bovis</i>	nPCR	CGTCA	Acytb ¹	195	Romero-Salas <i>et al.</i> (2016)
		CAAATCCTTTGCAAAC			
<i>B. bovis</i>	nPCR	TCCAA	Acytb ¹	195	Romero-Salas <i>et al.</i> (2016)
		TCCAA			

		TCCAACACCAAATCCT			Romero-Salas
		CCTA			<i>et al.</i> (2016)
	PCR	CGTGGGGTTTCGTTTTTG	Acytb	394	
<i>B. bigemina</i>		TAT			
		AAGAGATACCATATCA			Romero-Salas
		GGGAACCA			<i>et al.</i> (2016)
	nPCR	TTGGGCACTTCGTTATT		250	
		TCC			
		ATACGGCCCATATTCC			Criado-
Hemotropic		TACG	16S		Fornelio <i>et al.</i>
<i>Mycoplasma</i>	PCR	TGCTCCACCACTTGTTTC	RNA	~595	(2003)
		A			

¹Acytb: Apocytochrome b.

Thermocycling conditions of nPCR amplifications for *A. marginale* were adapted from Silveira *et al.* (2012) with an initial denaturation – 5 min/94 °C, followed by 29 cycles consisted of denaturation – 1 min/92 °C, annealing – 1 min/63 °C, and an extension reaction – 1 min/72 °C, and a final extension reaction – 8 min/72 °C, and for the other, according to Table 1. The amplicons were analyzed by electrophoresis on a 1 % agarose gel for *A. marginale* and HM, and 1.8 % for *B. bovis* and *B. bigemina*, stained with ethidium bromide, and visualized by transillumination by UV light (L-PIX, Epi-Light, Loccus Biotecnologia, SP, Brazil), program L-PIX Image, 2.7 version.

The data were tabulated in Excel 2016, and the frequencies of hemopathogens in blood and colostrum were calculated as percentages.

7.3 RESULTS AND DISCUSSION

The analyzes from blood demonstrated the presence of all agents investigated. The frequencies of 95.19 % (99/104), 52.88 % (55/104), 62.5 % (65/104), and 74.85 % (82/104) were observed for *A. marginale*, *B. bovis*, *B. bigemina*, and HM, respectively (**Table 2**), demonstrating a high occurrence of hemopathogens and an endemic state, especially for anaplasmosis and hemoplasmosis. From these high frequencies, the search in BC evidenced frequencies of 12.12 % (12/99), 10.91 % (6/55), and 6.1 % (5/82) for *A. marginale*, *B. bovis*, and HM, respectively. In total, 22.12 % (23/104) of colostrum samples tested positive for one of the researched agents. The hemopathogen *B. bigemina* was not detected in any BC.

Table 2. Frequency of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *B. bigemina*, and hemotropic *Mycoplasma* spp. in the blood and colostrum of dairy cows.

Hemopathogen	N	Blood sample ¹ (%)	Total colostrum sample ² (%)	Colostrum sample of positive animals ³ (%)
<i>A. marginale</i>	104	95.19	11.53	12.12
<i>B. bovis</i>	104	52.88	5.77	10.91
<i>B. bigemina</i>	104	62.5	0	0
HM ⁴	104	74.85	4.8	6.1

¹Blood sample: Frequency of positive animals in the total blood samples collected;

²Total colostrum sample: Frequency of positive colostrum samples in relation to the total samples collected;

³Colostrum sample os positive animals: Frequency of positive colostrum samples in relation to the positive cows ;

⁴HM : Hemotropic *Mycoplasma* spp.

In the present study, co-infection in blood was observed between hemopathogens related to BPS, and between these and HM, highlighting the occurrence of 75 % for *A. marginale* plus HM (**Table 3**). Both anaplasmosis and hemoplasmosis can lead to anemia, increased risk of secondary infections and decreased milk production (Kocan *et al.*, 2010; Tagawa *et al.*, 2013). Bovine infection by HM is commonly associated with *Mycoplasma wenyonii* and/or ‘*Candidatus Mycoplasma hemobos*’, it can manifest as either acute or chronic, with reports of apparently healthy cows testing positive being common (de Souza and Ruegg, 2023), such as in the present study. Coinfections were not observed in colostrum samples.

Table 3. Frequency of co-infection between *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *B. bigemina*, and hemotropic *Mycoplasma* spp. in the blood of dairy cows.

Co-infection	N	Blood sample (%)
<i>Am</i> ¹ + <i>Bo</i> ²	104	52.88
<i>Am</i> + <i>Bi</i> ³	104	59.61
<i>Bo</i> + <i>Bi</i>	104	34.61
<i>Am</i> + <i>Bo</i> + <i>Bi</i>	104	34.61
<i>Am</i> + HM ⁴	104	75.00
<i>Bo</i> + HM	104	40.38
<i>Bi</i> + HM	104	50.96
<i>Am</i> + <i>Bo</i> + HM	104	40.38

<i>Am</i> + <i>Bi</i> + HM	104	48.08
<i>Am</i> + <i>Bo</i> + <i>Bi</i> + HM	104	27.88
<i>Bo</i> + <i>Bi</i> + HM	104	27.88

¹*Am*: *Anaplasma marginale*;

²*Bo*: *Babesia bovis*;

³*Bi*: *Babesia bigemina* ;

⁴HM : Hemotropic *Mycoplasma* spp.

Studies on the vertical transmission of *A. marginale* reveal the possibility of an important role of this route in the epidemiology and maintenance of the agent within the herd (Kocan *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2016). With varying frequencies of positive calves born, it is known that the transfer of some hemopathogens by transplacental transmission can occur from apparently healthy cows (Costa *et al.*, 2016). Given the presumed absence of clinical signs that lead to the diagnosis of anaplasmosis, babesiosis, or hemoplasmosis in pregnant females, it would be assumed that the ricketsemia and parasitemia in these animals is low, and these animals can be classified as carriers of these agents. This fact highlights the ability of infection and transposition of placental barriers, even in animals that do not present acute clinical signs of these diseases during gestation (Andrade *et al.*, 2024), and the necessity of studies for elucidate its mechanisms.

Munderloh *et al.* (2004) have already suggested the possibility of infection of endothelial cells by *A. marginale* as a potential factor that could contribute to the persistence of the infection. Nevertheless, the intraerythrocytic stage is remains the only one recognized form of *A. marginale* in the bovine host (Kocan *et al.*, 2010; Wamsley *et al.*, 2011), and it could be assumed that the circulation of free forms capable of traversing barriers, such as those

between mother and fetus, would not be possible under normal conditions. Although HM has been reported in vertical transmission, there is no confirmation of fetal or neonatal calf deaths attributed to HM (Andrade *et al.*, 2024), and its epidemiology and pathogenesis still being studied (Ferreira *et al.*, 2022).

Additionally, erythrophagocytosis mechanisms that can occur in different sites, such as trophoblast cells (Murai and Yamauchi, 1986), possibly haemal nodes (Cerutti and Guerrero, 2008), and phagocytosis (Kocan *et al.*, 2010) may result in the release of the agent, allowing infection of new cells, as well as the release of DNA fragments, both of which could cross the placenta or mammary epithelium. In the case of transplacental transmission, it is known that fetuses can indeed be infected due to pathological diagnosis of anaplasmosis under experimental or natural conditions already reported, demonstrating the viability of the agent in the maternal-fetal circulation (Swift and Palmer, 1976; Henker *et al.*, 2020). Furthermore, *B. bovis* have also been reported in neonates, aborted fetuses, stillbirths, and acute cases of babesiosis shortly after birth, while *B. bigemina* was detected as detected in neonates without any associated lesions, demonstrating the occurrence of infection via transplacental transmission for both (Costa *et al.*, 2016). Genetic characteristics and divergences among strains of hemopathogens have been pointed out as possible factors associated with the microorganism's ability to cross uterine and placental barriers (Silvestre *et al.*, 2016).

Hornok *et al.* (2011) reported for the first time the intrauterine infection by HM in cattle from northern Hungary, represented by 10.5 %. In the same study, they identified potential vectors for HM dissemination besides ticks, such as *Stomoxys calcitrans* and *Haematobia irritans*, which could help explain the frequency of bloodstream co-infection of *A. marginale* and HM in the present study. In our case, the frequency of HM was investigated in a generic manner. However, prevalence studies have been conducted in Brazil with focus on '*Candidatus*

Mycoplasma hemobos' (Giroto *et al.*, 2012; de Mello *et al.*, 2016), demonstrating HM of 1.5 % (de Mello *et al.*, 2016) in beef cattle, and 40.9% (Giroto *et al.*, 2016) in dairy cattle. In addition, the transplacental transmission of '*Candidatus Mycoplasma hemobos*' was detected in 18.2 % (Giroto *et al.*, 2012) and 42.75 % (Andrade *et al.*, 2024), for aborted and slaughtered fetuses, respectively. Possibly, the greater availability of vectors for *A. marginale*, as classical transmission of *Babesia* requires the presence of ticks, which could be a contributing factor to the higher transplacental transmission rate of *A. marginale* and HM.

The present results demonstrate a high occurrence of positive animals in blood for *A. marginale* and HM, which may represent losses in animal performance, especially since the diagnosis of this type of infection is still uncommon in the clinical routine and sanitary management of herds. However, co-infection with HM and at least one species of *Babesia* was 40.38% and 50.96 % for *B. bovis* and *B. bigemina*, respectively. The co-infection rate with *B. bigemina* in the present study is in line with the higher frequency of blood samples positive for this agent than for *B. bovis*. This reinforces the idea of greater dissemination of *A. marginale* and HM, possibly due to the facilities and system, which allowed less contact of the animals with ticks. In Michigan, USA, Ferreira *et al.* (2024) demonstrated an increase in the diagnosis of females positive for '*Candidatus Mycoplasma hemobos*' as the animals get older, reaching up to 100 %.

The DNA of *A. marginale* and *A. ovis* in milk from cow and goat apparently healthy and naturally infected, also in the present study, have been reported in Philippines by Dela Cruz *et al.* (2019) and China, by Zhang *et al.* (2016), respectively. On the other hand, an experimental infection of sheep with *T. vivax*, Bezerra *et al.* (2023) reported the identification of DNA of *T. vivax* in the colostrum of six inoculated goats. These authors reported five positives out of six samples collected 12 h after delivery, one positive out of six in transition

milk collected 24 h after delivery, and no positive samples at 48 h, suggesting that the cross by hemopathogens probably occurs during colostrigenesis. The lambs that received this colostrum were monitored for 30 days and did not show positive PCR for the agent; however, the presence of specific antibodies or other protective factors was not investigated.

Regarding the way the studied agents reach BC, we suppose the relaxation of the cellular junctions of the mammary gland epithelium during colostrogenesis may be one of the means used for pathogens to cross the barriers (Baumrucker *et al.*, 2021). Besides, the weakening of these junctions may be linked to another factors, such as a local inflammation (Weellnitz *et al.*, 2015), or a subclinical acute ruminal acidosis (Wang *et al.*, 2023). Wellnitz *et al.* (2015) demonstrated a significant increase in serum α -lactalbumin concentration after the inoculation of LPS from *Escherichia coli*, and a rapid increase in of immunoglobulin-G and albumin concentrations in milk. While Wang *et al.* (2023) reported that subacute ruminal acidosis elevated levels of proinflammatory mediators in the mammary gland, leading to increased local inflammation and reduced integrity of the cellular junctions.

The molecular detection of *A. marginale*, *B. bovis*, and HM in BC in the present study does not allow inferring the viability of the agents. Even if the viability of the agents is proven in future studies, BC and transition milk presents a wide range of antimicrobial factors, pH, and immunoglobulins (Lopez and Heinrichs, 2022), including the specific for these agents, which would be expected in herds with enzootic stability. Echaide *et al.* (2005) reported the presence of specific antibodies against major surface protein-5 of *A. marginale* in milk from cows in a non-endemic region of Argentina. In this regard, the presence of specific immunoglobulins in BC alongside infected erythrocytes and the diversity of immunological elements may be a factor in the neutralization and elimination of the pathogen, leading to the possibility that the detection capacity of the agent is underestimated. Issues such as the

neutralization capacity and protection by antibodies present in colostrum, survival of the infected erythrocyte from the mother in the calf's circulation, and the agent's ability to multiply between the mother's and the calf's erythrocytes would need to be investigated.

We believe that even if hemopathogens are viable in BC, the possibility of infecting the neonate may occur. Despite the composition and physicochemical characteristics of colostrum and digestion, some factors such as anti-trypsinase, low profile of enzymes and acids, contribute to maintaining the integrity of biological factors (Lopez and Heinrichs, 2022), as well as altered permeability in the first hours after birth (Araújo *et al.*, 2015). Moreover, the invasion of the gastrointestinal epithelium of newborn calves has been previously reported, highlighting bacterial adhesion to enterocytes and passage through pinocytosis (Corley *et al.*, 1977; Staley and Bush, 1985). In addition to the potential direct damage to the calf, the invasion also results in a reduction in the absorption capacity of immunoglobulins, and may alter the colonization by beneficial microorganisms (Fischer *et al.*, 2018).

In the context of the sanitary and economic challenges imposed by hemopathogens and based on the known mechanisms of transfer of blood elements to colostrum during colostrogenesis, study of hemopathogens in BC and milk is important to provide new knowledge. The present findings can be used as a first step to further research related to these and may contribute to understanding the mechanisms of barrier crossing by hemopathogens. Furthermore, it is suggested that the viability of the agents in the BC and their potential for transmission by this route be investigated in future studies, including in transition milk, and milk from cows with clinical and subclinical mastitis.

Proper management practices are essential to mitigate the risks related to the hemopathogens, and ensure the health and well-being of newborn. Significant portion of the

animals may affect by individual or co-infection hemopathogens in herds. This underscores the importance of diagnosis and sanitary control strategies to promote the health.

7.4 CONCLUSIONS

This study is the first to report the molecular diagnosis of *A. marginale*, *B. bovis* and hemotropic *Mycoplasma* in bovine colostrum. The presence of the DNA is insufficient to confirm the viability of these hemopathogens or the possibility of infection through this route. However, these results shed light on the need for further investigations to understand the role of these findings in the epidemiology of these hemopathogens.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de técnicas mais acuradas para processamento de amostras de colostro bovino é importante ferramenta para contribuição em diagnósticos e pesquisas futuras. Nesse sentido, o presente trabalho demonstrou protocolo de lavagem e extração de DNA em colostro que pode auxiliar pesquisas futuras de diferentes patógenos.

No nosso conhecimento, o presente estudo foi o primeiro a reportar diagnóstico dos hemopatogenos *A. marginale*, *B. bovis* e *Mycoplasma* spp. hemotrópico em colostro bovino em vacas portadoras, clinicamente saudáveis, e naturalmente infectadas. Embora não se possa confirmar a viabilidade dos agentes pelas técnicas aplicadas, estes achados trazem ressaltam importante ponto de atenção em relação ao manejo sanitário, que pode ser expandido para surgimento de pesquisas com foco também em outros agentes.

Embora ainda não reconhecida para *Mycoplasma* spp. hemotrópico, a comprovada viabilidade de *A. marginale* e *B. bovis* em fetos e recém-nascidos bovinos pode ser um indício de que esses agentes também tenham habilidade de alcançar o colostro bovino preservando características que confirmam viabilidade. Investigações futuras são necessárias no sentido de

elucidar essas questões, uma vez que características físico-químicas do colostro e outros fatores poderiam contribuir para não infecção do recém-nascido na hipótese de agentes viáveis, de modo que a importância epidemiológica desses achados precisa ser melhor compreendida.

Sugere-se que avaliações futuras considerem investigar as características físico-químicas e microbiológicas do colostro e da secreção láctea das ordenhas subsequentes até liberação do leite, além de amostragem do leite de vacas com mastite clínica e subclínica a qualquer tempo da lactação. Para aprofundamento, sugere-se ainda acompanhamento de parâmetros como presença de marcadores de permeabilidade, inibidores e antimicrobianos naturais ou não, bem como caracterização e titulação de imunoglobulinas, em sangue e colostro.

De qualquer forma, diante da intensificação dos sistemas, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, o distanciamento dos animais em relação aos vetores desses hemopatógenos gera pressão sobre a transmissão vertical como meio importante de disseminação.

9. CONCLUSÕES

O protocolo de lavagem das amostras de colostro com PBS 1X demonstrou ser mais adequado, tendo apresentado maior concentração de DNA em ng/ μ L e, proporcionalmente, valores de razão de pureza entre 1,6 e 2, considerados aceitáveis para outros tipos de material biológico.

Foi identificado DNA de um dos hemopatógenos pesquisados em 22,12 % (23/104) das amostras de colostro avaliadas, sendo 12,12 % (12/99) de *A. marginale*, 10,91 % (6/55) de *B. bovis* e 6,1 % (5/82) de *Mycoplasma* spp. hemotrópico, entre os animais com PCR positivo no sangue para esses agentes.

REFERÊNCIAS

Abbas, A.; Lichtman, A. H.; Pober, J. S. **Imunologia Celular & Molecular**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

Agostini, C.; Kreling, C. S.; Bustamante-Filho, I. C.; Souza, C. F. V.; Biolchi, V.; Pozzobon, A. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de leite bovino in natura. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, 67(389):15-20, 2012. <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20120073>.

Amorim, L. S.; Wenceslau, A. A.; Carvalho, F. S.; Carneiro, P. L.; Albuquerque, G. R. Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 23(3):328-336, 2014. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612014064>.

Andrade, L. S. Infecção por hemoparasitos e *Neospora caninum* em fetos bovinos de diferentes idades gestacionais oriundos de abatedouro. Tese (Doutorado em Clínica e Cirurgia de Ruminantes) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.

Andrade, L. S.; de Souza, R. S.; Carvalho de Araujo, A.; Silva, S. O.; Melo, M. N.; Melo, F. G.; Ribeiro, G. H. S.; de Sousa, F. G.; Bastos, C. V.; Moreira, T. F.; Meneses, R. M.; Carvalho, A. U.; Facury-Filho, E. J.; Silveira, J. A. G. Hemopathogens in naturally infected bovine fetuses in Brazil. **Ticks Tick Borne Dis.**, 15(5):102351, Sep 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2024.102351>.

Araújo, G.; Yunta, C.; Terré, M.; Mereu, A.; Ipharraguerre, I.; Bach, A. Intestinal permeability and incidence of diarrhea in newborn calves. **J. Dairy Sci.**, 98(10):7309-7317, 2015. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9666>.

Armengol, R.; Fraile, L. Colostrum and milk pasteurization improve health status and decrease mortality in neonatal calves receiving appropriate colostrum ingestion. **J. Dairy Sci.**, 99(6), 4718-4725, 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10728>.

Atif, F. A.; Hussain, K.; Qamar, M. F.; Sajid, M. S.; Zaman, M. A.; Rafique, M. K. First report on transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in neonatal dairy calves from District Jhang, Punjab, Pakistan. **Int. J. Agric. Biol.**, 25(3):541-546, 2021. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1699>.

Aubry, P.; Geale, D. W. A review of bovine anaplasmosis. **Can. Food Inspect. Agency**, Ottawa, ON, Canadá, 58:1-30, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>.

Azevedo, R. A.; Lage, C. F. A.; Silper, B. F.; Diniz Neto, H. C.; Quigley, J. D.; Coelho, S. G. Invited review: Total solids concentration in milk or milk replacer for dairy calves. **J. Dairy Sci.**, 106(11):7341-7351, 2023. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23372>.

Azevedo, R. A.; Lombardi, M. C.; Coelho, S. G.; Meneses, R. M. Criação de bezerros no Brasil. **Cad. Técn. Vet. Zootec.**, 102(1):9-15, 2022.

Bahia, M.; Silva, J. S.; Gontijo, I. S.; Cordeiro, M. D.; Santos, P. N. D.; Silva, C. B. D.; Nicolino, R. R.; Mota, D. A.; Silva, J. B. D.; Fonseca, A. H. Characterization of cattle tick fever in calves from the northwestern region of Minas Gerais, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 29(1), e017119, 2020. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020011>.

Barrington, G. M.; Parish, S. M. Bovine neonatal immunology. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, 17:463-476, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30001-3](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30001-3).

Baumrucker, C. R.; Bruckmaier, R. M. Colostrogenesis: IgG1 transcytosis mechanisms. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, 19(1):103-117, Mar 2014. <https://doi.org/10.1007/s10911-013-9313-5>.

Baumrucker, C. R.; Macrina, A. L.; Bruckmaier, R. M. Colostrogenesis: Role and Mechanism of the Bovine Fc Receptor of the Neonate (FcRn). **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.**, 26(4):419-453, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10911-021-09506-2>.

Belkahia, H.; Ben Abdallah, M.; Andolsi, R.; Selmi, R.; Zamiti, S.; Kratou, M.; Mhadhbi, M.; Darghouth, M. A.; Messadi, L.; Ben Said, M. Screening and analysis of *Anaplasma marginale* Tunisian isolates reveal the diversity of lipA phylogeographic marker and the conservation of OmpA protein vaccine candidate. **Front. Vet. Sci.**, Section Parasitology, 21:8:731200, 2021. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.731200>.

Bezerra, N. M.; Teófilo, T. S.; Araújo Júnior, H. N.; Silva, J. B.; Moura, G. H. F.; Costa, K. M. F. M.; Paiva, K. A. R.; Batista, J. S. Experimental infection by *Trypanosoma vivax* in goats in the Brazilian semiarid: detection of *T. vivax* DNA in colostrum and assessment of lactogenic transmission. **Pesq. Vet. Bras.**, 43, e07119, 2023. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-7119>.

Bielefeldt-Ohmann, H.; Tolnay, A. E.; Reisenhauer, C. E.; Hansen, T. R.; Smirnova, N.; Van Campen, H. Transplacental infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus types 1b and 2: viral spread and molecular neuropathology. **J. Comp. Pathol.**, 138(2-3):72-85, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.10.006>.

Birkenheuer, A. J.; Levy, M. G.; Breitschwerdt, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **J. Clin. Microbiol.**, 41(9):4172-4177, 2003.

<https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003>.

Boularias, G.; Azzag, N.; Gandoin, C.; Bouillin, C.; Chomel, B.; Haddad, N.; Boulouis, H. J. Bovines harbor a diverse array of vector-borne pathogens in Northeast Algeria. **Pathogens**, 9(11), 883, 2020. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110883>.

Brown, C. W. Adaptative immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: Implications for bacterial persistence. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 35(3), 241-252, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.12.002>.

Brownlie, J.; Hooper, L. B.; Thompson, I.; Collins, M. E. Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhoea virus (BVDV) - the bovine pestivirus. **Clin. Diagn. Virol.**, 10(2-3), 141-150, 1998. [https://doi.org/10.1016/s0928-0197\(98\)00030-0](https://doi.org/10.1016/s0928-0197(98)00030-0).

Caldart, E. T.; Chiappetta, C. M.; Lopes, E. F.; Ravazzolo, A. P. Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes. **Acta Sci. Vet.**, 39(1), 945, 2011. Disponível em <https://www.redalyc.org/pdf/2890/289022244006.pdf>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2024.

Carvalho, T. P.; Silva, L. A. D.; Castanheira, T. L. L.; Souza, T. D.; Paixão, T. A. D.; Lazaro-Anton, L.; Tsolis, R. M.; Santos, R. L. Cell and Tissue Tropism of *Brucella* spp. **Infect. Immun.**, 91(5):e0006223, 2023. <https://doi.org/10.1128/iai.00062-23>.

Cerutti, P.; Guerrero, F. Erythropoiesis and erythrophagocytosis in bovine haemal nodes. **Int. J. Morphol.**, 26(3):557-562, 2008. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022008000300008>.

Chase, C. C.; Hurley, D. J.; Reber, A. J. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, 24(1):87-104, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.11.001>.

Chen, B.; Tang, G.; Guo, W.; Lei, J.; Yao, J.; Xu, X. Detection of the core bacteria in colostrum and their association with the rectal microbiota and with milk composition in two dairy cow farms. **Animals (Basel)**, 11(12):3363, Nov 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11123363>.

Coelho, M. F. Epidemiologia da tristeza parasitária bovina em diferentes categorias de bovinos de corte em confinamento e avaliação da transmissão vertical. 74 p. (Dissertação de Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária da UFMG, 2022.

Corley, L. D.; Staley, T. E.; Bush, L. J.; Jones, E. W. Influence of colostrum on transepithelial movement of *Escherichia coli* 055. **J. Dairy Sci.**, 60(9):1416-1421, 1977.

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)84046-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)84046-0).

Cortese, V. S. Neonatal immunology. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, 25:221-227, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.003>.

Costa, A. L. B.; Lombardi, M. C.; Diniz, H. C.; Silva, V. R. C.; Gomes, V. Criação de bezerros no Brasil. **Cad. Técn. Vet. Zootec.**, 102(3), 33-44, 2022.

Costa, S. C. L.; Magalhães, V. C. S.; 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 Dis.**, 7(2):270-275, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.11.001>.

Criado-Fornelio, A.; Martinez-Marcos, A.; Buling-Saraña, A.; Barba-Carretero, J. C. Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: A molecular study. **Vet. Microbiol.**, 93(4):307-317, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00044-0).

Czibener, C.; Ugalde, J. E. Identification of a unique gene cluster of *Brucella* spp. that mediates adhesion to host cells. **Microbes Infect.**, 14(1):79-85, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.08.012>.

Das, D.; Sarma, K.; Eregowda, C. G.; Roychoudhury, P.; Rajesh, J. B.; Behera, P.; Prasad, H.; Lalrinkima, H.; Aktar, F.; Bora, N.; Deka, C.; Thakur, N.; Tolenkhomba, T. C. Naturally occurring *Anaplasma marginale* infection in cattle: Molecular prevalence and associated risk factors, haemato-biochemical alterations, oxidant/antioxidant status and serum trace mineral levels. **Microb. Pathog.**, 167:105575, Jun 2022. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105575>.

de la Fuente, J.; Ruiz-Fons, F.; Naranjo, V.; Torina, A.; Rodríguez, O.; Gortázar, C. Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. **Res. Vet. Sci.**, 84(3):382-386, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.05.018>.

de Mello, V. V. C.; Souza Ramos, I. A.; Herrera, H. M.; Mendes, N. S.; Calchi, A. C.; Campos, J. B. V.; Macedo, G. C.; Alves, J. V. A.; Machado, R. Z.; André, M. R. Occurrence and genetic diversity of hemoplasmas in beef cattle from the Brazilian Pantanal, an endemic area for bovine trypanosomiasis in South America. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, 66:101337, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101337>.

de Souza Ferreira, L.; Bolin, S.; Abuelo, A.; Norby, B.; Ruegg, P. L. Apparent prevalence of hemotropic mycoplasma in dairy calves and replacement heifers on Michigan farms. **J. Dairy Sci.**, 107(7):4987-5000, 2023. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24395>.

De Souza, F. L.; Ruegg, P. L. Graduate Student Literature Review: Hemotropic mycoplasmas in cattle. **J. Dairy Sci.**, 107(5):3185-3196, 2023. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24120>.

De Vliegher, S.; Fox, L. K.; Piepers, S.; McDougall, S.; Barkema, H. W. Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **J. Dairy Sci.**, 95:1025-1040, 2012. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-4074>.

Dela Cruz, A. P.; Galay, R. L.; Sandalo, K. A. C.; Pilapil-Amante, F. M. I. R.; Tanaka, T. Molecular detection of *Anaplasma* spp. in blood and milk of dairy cattle in the Philippines. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, 43:540-545, 2019. <https://doi.org/10.3906/vet-1903-27>.

Dibbern, A. G.; Botaro, B. G.; Viziack, M. P.; Silva, L. F. P.; Santos, M. V. Evaluation of methods of DNA extraction from *Staphylococcus aureus* in milk for use in real-time PCR. **Genet. Mol. Res.**, 14(1):227-233, 2015. <https://doi.org/10.4238/2015.January.16.6>.

Diniz Neto, H. C.; Lombardi, M. C.; Leao, A. E.; Coelho, S. G. Dieta Líquida acidificada para bezerros: Efeitos sobre o desempenho e saúde no aleitamento e pós-desaleitamento. **Rev. Eletr. Nutritime**, 15:8352, 2018.

Doyle, R. L.; França, R. T.; Oliveira, C. B.; Rezer, J. F. P.; Klafke, G. M.; Martins, J. R.; Santos, A. P.; Nascimento, N. C. do, Mesick, J. B.; Lopes, S. T. A.; Leal, D. B. R.; Da Silva, A. S.; Andrade, C. M. Cattle experimentally infected by *Anaplasma marginale*: Influence of splenectomy on disease pathogenesis, oxidative profile, and antioxidant status. **Microb. Pathog.**, 95:193-199, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.04.011>.

Drew, T. W.; Yapp, F.; Paton, D. J. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. **Vet. Microbiol.**, 64(2-3):145-154, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(98\)00266-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(98)00266-1).

Echaide, S. T.; Bono, M. F.; Lugaresi, C.; Aguirre, N.; Mangold, A.; Moretta, R.; Farber, M.; Mondillo, C. Detection of antibodies against *Anaplasma marginale* in milk using a recombinant MSP5 indirect ELISA. **Vet. Microbiol.**, 106(3-4):287-292, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.12.026>.

Elizondo-Salazar, J. A.; Heinrichs, A. J. Feeding heat-treated colostrum to neonatal dairy

heifers: effects on growth characteristics and blood parameters. **J. Dairy Sci.**, 92(7):3265-3273, 2009. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1667>.

Ezzat Alnakip, M.; Quintela-Baluja, M.; Böhme, K.; Fernández-No, I.; Caamaño-Antelo, S.; Calo-Mata, P.; Barros-Velázquez, J. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. **J. Vet. Med.**, 2014:2014:659801, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/659801>.

Fedorina, E. A.; Arkhipova, A. L.; Kosovski, G. Y.; Kovalchuk, S. N. Molecular survey and genetic characterization of *Anaplasma marginale* isolates in cattle from two regions of Russia. **Ticks Tick-borne Dis.**, 10(2):251-257, 2019.

Feng, Z.; Shen, Y.; Fan, G.; Li, T.; Wu, C.; Ye, Y. Unravelling the proteomic profiles of bovine colostrum and mature milk derived from the first and second lactations. **Foods**, 12(22):4056, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12224056>.

Ferreira, G. C. M.; Canozzi, M. E. A.; Peripolli, V.; Moura, G. P.; Sánchez, J.; Martins, C. E. N. Prevalence of bovine *Babesia* spp., *Anaplasma marginale*, and their co-infections in Latin America: Systematic review-meta-analysis. **Ticks Tick-borne Dis.**, 13(4):101967, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101967>.

Ferreira, L. S.; Bolin, S.; Abuelo, A.; Norby, B.; Ruegg, P. L. Apparent prevalence of hemotropic mycoplasma in dairy calves and replacement heifers on Michigan farms. **J. Dairy Sci.**, 107(7):4987-5000, 2024. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24395>.

Fioretti, D. P.; Piergili, P.; Pasquali, M.; Diaferia, M.; Mangili, V.; Rosignoli, L. *Neospora caninum* Infection and Congenital Transmission: Serological and Parasitological Study of Cows up to the Fourth Gestation. **J. Vet. Med. B**, 50(8):399-404, 2003.

Fischer, A. J.; Song, Y.; He, Z.; Haines, D. M.; Guan, L. L.; Steele, M. A. Effect of delaying colostrum feeding on passive transfer and intestinal bacterial colonization in neonatal male Holstein calves. **J. Dairy Sci.**, 101(4):3099-3109, 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13397>.

Floren, H. K.; Sischo, W. M.; Crudo, C.; Moore, D. A. Technical note: Use of a digital and an optical Brix refractometer to estimate total solids in milk replacer solutions for calves. **J. Dairy Sci.**, 99(9):7517-7522, 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10834>.

Gale, K. R.; Leateh, G.; Gartside, M.; Dimmoek, C. M. *Anaplasma marginale*: failure of sera from immune cattle to confer protection in passive-transfer experiments. **Parasitol. Res.**, 78:410M15, 1992.

Gallina, L.; Koch, M. C.; Gentile, A.; Treglia, I.; Bombardi, C.; Mandrioli, L.; Bolcato, M.; Scagliarini, A.; Drögemüller, C.; Seuberlich, T.; Ciulli, S. Bovine viral diarrhoea virus 1b infection associated with congenital tremor and hypomyelination in Holstein calves. **Vet. Microbiol.**, 256:109047, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109047>.

Gasparini, M. R.; Vieira, R. F. C.; Nascimento, D. A. G.; Garcia, J. L.; Vidotto, O.; Vidotto, M. C. Immune response of calves inoculated with proteins of *Anaplasma marginale* bound to an immunostimulant complex. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 22(2):253-259, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000200042>.

Georgiev, I. P. Differences in chemical composition between cow colostrum and milk. **Bulgarian J. Vet. Med.**, 11(1), 3-12, 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Ivan-Georgiev-17/publication/242226195_Differences_in_chemical_composition_between_cow_colostrum_and_milk/links/0a85e5301a0e5dac72000000/Differences-in-chemical-composition-between-cow-colostrum-and-milk.pdf?__cf_chl_tk=YrI6MVPVbJolRPPw06dhVaHGCx9Wrcot6LsbVT2DI9g-1741304437-1.0.1.1-E4w2812UP4B4gsh4alc2T13ITNnsfQM9W3BXvEQ7Tw0. Acesso em: 10 de fevereiro de 2024.

Ghosh, S.; Iacucci, M. Diverse immune effects of bovine colostrum and benefits in human health and disease. **Nutrients**, 13(11):3798, 2021. <https://doi.org/10.3390/nu13113798>.
Gille, L.; Evrard, J.; Callens, J.; Supré, K.; Grégoire, F.; Boyen, F.; Haesebrouck, F.; Deprez, P.; Pardon, B. The presence of *Mycoplasma bovis* in colostrum. **Vet. Res.**, 51(1):54, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00778-w>.

Giroto, A.; Zangirólamo, A. F.; Bogado, A. L. G.; Luz, A. S.; Souza, G. C. F. da Silva; Garcia, J. L.; Vilas Boas, L. A.; Biondo, A. W.; Vidotto, O. Molecular detection and occurrence of ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ in dairy cattle of Southern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 21:342-344, 2012. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612012000300034>.
Giroto-Soares, A.; Soares, J. F.; Bogado, A. L. G.; de Macedo, C. A. B.; Sandeski, L. M.; Garcia, J. L.; Vidotto, O. ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’: Transplacental transmission in

dairy cows (*Bos taurus*). **Vet. Microbiol.**, 195:22-24, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.020>.

Godden, S. Colostrum management for dairy calves. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, 24:19-39, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.10.005>.

Godden, S.; Lombard, J. E.; Woolums, A. R. Colostrum management for dairy cows. **Vet. Clin. Food Anim.**, 35:535-556, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.07.005>.

Gonzalez, D. D.; Rimondi, A.; Perez Aguirreburualde, M. S.; Mozgovej, M.; Bellido, D.; Wigdorovitz, A.; Dus Santos, M. J. Quantitation of cytokine gene expression by real-time PCR in bovine milk and colostrum cells from cows immunized with a bovine rotavirus VP6 experimental vaccine. **Res. Vet. Sci.**, 95(2):703-708, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.03.016>.

Gomes, V.; Hoffmann, C.; Castro-Tardón, D. I.; Ramos Dos Santos, F. C.; Suárez-Retamozo, S.; Hurley, D.J. Vertical transfer of gut microbiota from dam to neonate calf in the early of life. **Sci Rep.**, Sep 18;14(1):21746, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-72296-0>.

Gray, J. S.; Estrada-Peña, A.; Zintl, A. Vectors of Babesiosis. **Annu. Rev. Entomol.**, 64:149-165, 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-111932>.

Guglielmone, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Vet. Parasitol.**, 57(1-3):109-119, 1995. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)03115-d](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)03115-d).

Hanson, D. L.; Lonergan, G. H.; Brown, T. R.; Nisbet, D. J.; Hume, M. E.; Edrington, T. S. Evidence supporting vertical transmission of Salmonella in dairy cattle. **Epidemiol. Infect.**, 144:962-967, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0950268815002241>.

Harmon, R. Mastitis and milk quality. In F. Harding (Ed.), *Milk quality* (pp. 25-38). Springer, 1995.

Heller, L. M.; Zapa, D. M. B.; Couto, L. F. M.; de Aquino Gontijo, L. M.; Nicaretta, J. E.; de Moraes, I. M. L.; Salvador, V. F.; Leal, L. L. L. L.; Ferreira, L. L.; Iuasse, H. V.; Scarpa, A. B.; de Souza Martins, J. R.; Soares, V. E.; de Oliveira Monteiro, C. M.; Lopes, W. D. Z. Techniques for monitoring dairy calves against the tick fever agents: a comparative analysis. **Vet. Res. Commun.**, 46(3), 879-902, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09915-6>.

Henker, L. C.; Lorenzetti, M. P.; Fagundes-Moreira, R.; Dalto, A. G. C.; Sonne, L.; Driemeier, D.; Soares, J. F.; Pavarini, S. P. Bovine abortion, stillbirth and neonatal death associated with *Babesia bovis* and *Anaplasma* sp. infections in southern Brazil. **Ticks Tick-borne Dis.**, 11(4), 101443, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101443>.

Hoelzer, K.; Bielke, L.; Blake, D. P.; Cox, E.; Cutting, S. M.; Devriendt, B.; Van Immerseel, F. Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 1: challenges and needs. **Vet. Res.**, 49(1):64, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0551-0>.

Hoelzer, K.; Bielke, L.; Blake, D. P.; Cox, E.; Cutting, S. M.; Devriendt, B.; Erlacher-Vindel, E.; Goossens, E.; Karaca, K.; Lemiere, S.; Metzner, M.; Raicek, M.; Suriñach, M. C.; Wong, N. M.; Gay, C.; Immerseel, F. V. Vaccines as alternatives to antibiotics for food-producing animals. Part 2: New approaches and potential solutions. **Vet. Res.**, 49:70, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0561-7>.

Hogan, J. S.; Gonzalez, R. N.; Harmon, R. J.; Nickerson, S. C. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Madison, 1999.

Hopkins, S. G.; DiGiacomo, R. F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, 13(1):107-128, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30367-4](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30367-4).

Hornok, S.; Micsutka, A.; Meli, M. L.; Lutz, H.; Hofmann-Lehmann, R. Molecular investigation of transplacental and vector-borne transmission of bovine haemoplasmas. **Vet. Microbiol.**, 152:411-414, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.04.031>.

Houser, B. A.; Donaldson, S. C.; Kehoe, S. I.; Heinrichs, A. J.; Jayarao, B. M. A survey of bacteriological quality and the occurrence of Salmonella in raw bovine colostrum. **Foodborne Pathog. Dis.**, 5(6):853-858, 2008. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0141>.

Jaimes-Dueñez, J.; Triana-Chávez, O.; Mejía-Jaramillo, A. M. Genetic, host and environmental factors associated with a high prevalence of *Anaplasma marginale*. **Ticks Tick-borne Dis.**, 9(5):1286-1295, 2018.

Janeway Jr.; C. A.; Medzhitov, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, 20:197-216, 2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>.

Jasik, K. P.; Okła, H.; Słodki, J.; Rozwadowska, B.; Słodki, A.; Rupik, W. Congenital tick-borne diseases: Is this an alternative route of transmission of tick-borne pathogens in mammals? **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 15(11):637-644, 2015.

<https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1815>.

Jensen, N. E.; Møller, F.; Jensen, A. J.; Wegener, H. C. *Listeria monocytogenes* in bovine mastitis. Possible implication for human health. **Int. J. Food Microbiol.**, 32(1-2):209-216, 1996. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01105-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01105-1).

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(3):85-89, 2012.

Kamani, J.; Schaer, J.; Umar, A. G.; Pilarshimwi, J. Y.; Laminubukar, L.; González-Miguel, J. Molecular detection and genetic characterization of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma platys* in cattle in Nigeria. **Ticks Tick-borne Dis.**, 13:101955, 2022.

Kargar, S.; Bahadori-Moghaddam, M.; Ghoreishi, S. M.; Akhlaghi, A.; Kanani, M.; Pazoki, A.; Ghaffari, M. H. Extended transition milk feeding for 3 weeks improves growth performance and reduces the susceptibility to diarrhea in newborn female Holstein calves. **Animal**, 15(3):100151, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100151>.

Kelling, C. L.; Topliff, C. L. Bovine maternal, fetal and neonatal responses to bovine viral diarrhea virus infections. **Biologicals**, 41:20-25, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.09.006>.

Khudhair, Y. I.; Saleh, Z. F.; Ayyez, H. N. First study on microscopic and molecular evidences of two bovine hemoplasma species in cattle herds in Al-Qadisiyah Province, Iraq. **Vet. World**, 15(5):1323-1327, 2022. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.1323-1327>.

Klaus, G. G. B.; Jones, E. W. The Immunoglobulin Response in Intact and Splenectomized Calves Infected with *Anaplasma marginale*. **Immunology**, 100(5):991-999, 1968. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.100.5.991>.

Kocan, K. M.; de la Fuente, J.; Blouin, E. F.; Coetzee, J. F.; Ewing, S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Vet. Parasitol.**, 167:95-107, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>.

Kocan, K. M.; De La Fuente, J.; Blouin, E. F.; Garcia-Garcia, J. C. Adaptations of the tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, for survival in cattle and ticks. **Exp. Appl. Acarol.**, 28:9-25, 2002. <https://doi.org/10.1023/a:1025329728269>.

Kuckleburg, C. J.; Chase, C. C.; Nelson, E. A.; Marras, S. A. E.; Dammen, M. A.; Christopher-Hennings, J. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time

polymerase chain reactions. **J. Vet. Diagn. Invest.**, 15:72-76, 2003. <https://doi.org/10.1177/104063870301500117>.

Laforet, E. G.; Lynch, C. L. Multiple congenital defects following maternal varicella. **N. Engl. J. Med.**, 236(15):534-536, 1947. <https://doi.org/10.1056/NEJM194704102361504>.

Lee, C. S.; Wooding, F. B.; Kemp, P. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows' secretions, colostrum, and milk from normal cows. **J. Dairy Res.**, 47(1):39-50, 1980. <https://doi.org/10.1017/s0022029900020860>.

Lee, J. H.; Park, Y.; Choi, J. R.; Lee, E. K.; Kim, H. S. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. **Yonsei Med. J.**, 51(1):104-110, 2010. <https://doi.org/10.3349/ymj.2010.51.1.104>.

Leite, C. Q. F.; Anno, I. S.; Leite, S. R. A.; Roxo, E.; Morlock, G. P.; Cooksey, R. C. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 98(3):319-323, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000300005>.

Limesand, S. W.; Camacho, L. E.; Kelly, A. C.; Antolic, A. T. Impact of thermal stress on placental function and fetal physiology. In Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2018); Foz do Iguaçu, PR, Brazil, September 16th to 20th, 2018. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0056>.

Limesand, S. W.; Rozance, P. J.; Smith, D.; Hay, W. W. Jr. Increased insulin sensitivity and maintenance of glucose utilization rates in fetal sheep with placental insufficiency and intrauterine growth restriction. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 293:E1716-E1725, 2007. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00459.2007>.

Lindberg, A.; Groenendaal, H.; Alenius, S.; Emanuelson, U. Validation of a test for dams carrying foetuses persistently infected with bovine viral-diarrhea virus based on determination of antibody levels in late pregnancy. **Prev. Vet. Med.**, 51:199-214, 2001. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(01\)00229-x](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(01)00229-x).

Lindner, J. D.; Sanatarelli, M.; Yamaguishi, C. T.; Soccol, C. R.; Neviani, E. Recovery and identification of bovine colostrum microflora using traditional and molecular approaches. **Food Technol. Biotechnol.**, 49(3):364-368, 2011. Disponível em: https://www.ftb.com.hr/images/pdfarticles/2011/July-September/ftb_49_364.pdf. Acesso em: 09 de fevereiro de 2024.

Lipkin, E.; Mosig, M. O.; Darvasi, A.; Ezra, E.; Shalom, A.; Friedmann, A.; Soller, M. Quantitative trait locus mapping in dairy cattle by means of selective milk DNA pooling using dinucleotide microsatellite markers: analysis of milk protein percentage. **Genetics**, 149(3):1557-67, 1998. <https://doi.org/10.1093/genetics/149.3.1557>.

Liu, B.; Zhang, X.; Ding, X.; Bin, P.; Zhu, G. The vertical transmission of *Salmonella Enteritidis* in a One-Health context. **One Health**, 16:100469, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2022.100469>.

Lombard, J.; Urie, N.; Garry, F.; Godden, S.; Quigley, J.; Earleywine, T.; McGuirk, S.; Moore, D.; Branan, M.; Chamorro, M.; Smith, G.; Shivley, C.; Catherman, D.; Haines, D.; Heinrichs, A. J.; James, R.; Maas, J.; Sterner, K. Consensus recommendations on calf- and herd-level passive immunity in dairy calves in the United States. **Dairy Sci.**, 103:7611-7624, 2020. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17955>.

Lopez, A. J.; Heinrichs, A. J. Invited review: The importance of colostrum in the newborn dairy calf. **J. Dairy Sci.**, 105(4):2733-2749, 2022. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-20114>.

Mahuku, G. S. A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. **Plant Mol. Biol. Rep.**, 22:71-81, 2004. <https://doi.org/10.1007/BF02773351>.

Maunsell, F. P.; Woolums, A. R.; Francoz, D.; Rosenbusch, R. F.; Step, D. L.; Wilson, D. J.; Janzen, E. D. Mycoplasma bovis infections in cattle. **J. Vet. Intern. Med.**, 25:772-783, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0750.x>.

McDougall, S.; Parker, K. I.; Heuer, C.; Compton, C. W. R. A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. **Vet. Microbiol.**, 134:177-185, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.026>.

McGrath, B. A.; Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.; Kelly, A. L. Composition and properties of bovine colostrum: a review. **Dairy Sci. Technol.**, 96:133-158, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0258-x>.

Mendonça, F. L. M. Utilização de isolados de *Anaplasma marginale* de baixa virulência em protocolos de imunização de bezerros: análise dos efeitos pós-vacinais e proteção contra o desafio natural. Dissertação de Mestrado, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Brasil, 2015.

Mendonça, F. M.; Melo, I. O.; Vespasiano, L. C.; Lombardi, M. C.; Rezende, M. F. S.; de Souza, R. S.; Bastos, C. V.; Facury-Filho, E. J.; Carvalho, A. U. Tristeza parasitária bovina.

- Cad. Téc. Vet. Zootec., FEPMVZ, EV-UFMG e CRMV-MG**, 102(10):140-158, 2022.
- Meneses, R. M. Isolamento e caracterização molecular de *Anaplasma marginale* de origem congênita e avaliação da virulência em bezerros experimentalmente infectados. Dissertação (Mestrado em Clínica e Cirurgia de Ruminantes) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
- Mohler, V. L.; Izzo, M. M.; House, J. K. *Salmonella* in calves. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, 25(1):37-54, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.009>.
- Morrill, K. M.; Robertson, K. E.; Spring, M. M.; Robinson, A. L.; Tyler, H. D. Validating a refractometer to evaluate immunoglobulin G concentration in Jersey colostrum and the effect of multiple freeze-thaw cycles on evaluating colostrum quality. **J. Dairy Sci.**, 98(1):595-601, 2015. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8730>.
- Moskwa, B.; Pastusiak, K.; Bien, J.; Cabaj, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitol. Res.**, 100(3):633-636, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0288-7>.
- Mosqueda, J.; Olvera-Ramirez, A.; Aguilar-Tipacamu, G.; Canto, G. J. Current advances in detection and treatment of Babesiosis. **Curr. Med. Chem.**, 19:1504-1518, 2012. <https://doi.org/10.2174/092986712799828355>.
- Mukhtar, Y.; Mamo, G.; Tesfaye, B.; Belina, D. A review on major bacterial causes of calf diarrhea and its diagnostic method. **J. Vet. Med. Anim. Health**, 7(5):173-185, 2015. <https://doi.org/10.5897/JVMAH2014.0351>.
- Munderloh, U. G.; Lynch, M. J.; Herron, M. J.; Palmer, A. T.; Kurtti, T. J.; Nelson, R. D.; Goodman, J. L. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. **Vet. Microbiol.**, 101(1):53-64, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.02.011>.
- Murai, T.; Yamauchi, S. Erythrophagocytosis by the trophoblast in a bovine placentome. **The Jpn. J. Vet. Sci.**, 48(1):75-88, 1986. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.48.75>.
- Mutshembele, M.; Cabezas-Cruz, A.; Mtshali, M. S.; Thekiso, O. M. M.; Galindo, R. C.; De La Fuente, J. Epidemiology and evolution of the genetic variability of *Anaplasma marginale* in South Africa. **Ticks Tick-borne Dis.**, 5(6):624-631, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.011>.

Nazifi, S. M.; Razavi, B.; Kaviani, F.; Rakhshandehroo, E. Acute phase response in cattle infected with *Anaplasma marginale*. **Vet. Microbiol.**, 155(2-4):267-271, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.024>.

Neville, M. C.; McFadden, T. B.; Forsyth, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, 7(1):49-66, 2002. <https://doi.org/10.1023/a:1015770423167>.

Nicholls, C.; Li, H.; Liu, J. P. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 39(8):674-679, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05599.x>.

Niethammer, F. M.; Ade, J.; Hoelzle, L. E.; Schade, B. Hemotrophic mycoplasma in Simmental cattle in Bavaria: prevalence, blood parameters, and transplacental transmission of ‘Candidatus *Mycoplasma haemobos*’ and *Mycoplasma wenyonii*. **Acta Vet. Scand.**, 60(1):74, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0428-y>.

Palmer, G. H.; McElwain, T. F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. **Vet. Parasitol.**, 57, 233-253, 1995. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)03123-e](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)03123-e).

Palmer, G. H.; Knowles Jr.; D. P.; Rodriguez, J. L.; Gnad, D. P.; Hollis, L. C.; Marston, T.; Brayton, K. A. Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. **J. Clin. Microbiol.**, 42(11):5381-5384, 2004. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5381-5384.2004>.

Palmer, G. H.; Rurangirwa, F. R.; Kocan, K. M.; Brown, W. C. Molecular Basis for Vaccine Development against the Ehrlichial Pathogen *Anaplasma marginale*. **Parasitol. Today**, 15(7):233-253, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(99\)01469-6](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(99)01469-6).

Paré, J.; Thurmond, M. C.; Hietala, S. K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. **Can. J. Vet. Res.**, 60(2):133-139, 1996. PMC: 1263819.

Peres, N. D.; Lange, C. C.; Brito, M. A. V. P.; Brito, J. R. F.; Arcuri, E. F.; Cerqueira, M. M.O. P. Detection of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 62(4):973-979, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352010000400029>.

Potgieter, F. T.; van Rensburg, L. Tick transmission of *Anaplasma centrale*. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, 54(1), 5-7, 1987. PMID: 3587927.

Quigley, J. D.; Lago, A.; Chapman, C.; Erickson, P.; Polo, J. Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. **J. Dairy Sci.**, 96(2):1148-1155, 2013. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5823>.

Quigley, L.; O'Sullivan, O.; Beresford, T. P.; Ross, R. P.; Fitzgerald, G. F.; Cotter, P. D. A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. **J. Appl. Microbiol.**, 113:96-105, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05294.x>.

Quintero Rodríguez, L. E.; Domínguez, G.; Alvarado Pinedo, M. F.; Travería, G. E.; Moré, G.; Campero, L. M.; de la Sota, R. L.; Madoz, L. V.; Giuliadori, M. J. Association of bovine viral diarrhoea virus, bovine herpesvirus 1, and *Neospora caninum* with late embryonic losses in highly supplemented grazing dairy cows. **Theriogenology**, 194:126-132, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.10.002>.

Raboisson, D.; Trillat, P.; Cahuzac, C. Failure of Passive Immune Transfer in Calves: A Meta-Analysis on the Consequences and Assessment of the Economic Impact. **PLoS One**, 11(3):e0150452, Mar 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150452>.

Reinbold, J. B.; Coetzee, J. F.; Hollis, L. C.; Nickell, J. S.; Riegel, C. M.; Christopher, J. A.; Ganta, R. R. Comparison of iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques. **Am. J. Vet. Res.**, 71(10):1178-1188, 2010. <https://doi.org/10.2460/ajvr.71.10.1178>.

Ribeiro, M. F. B.; Lima, J. D.; Guimarães, A. M.; Scatamburlo, M. A.; Martins, N. E. Transmissão congênita da anaplasmosse bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 47(3):297-304, 1995.

Romero, A. R. S.; Nascimento, A. V.; Oliveira, M. C. S.; Okino, C. H.; Braz, C. U.; Scaletz, D. C. B.; Cardoso, D. F.; Cardoso, F. F.; Gomes, C. C. G.; Caetano, A. R.; Tonhati, H.; Gondro, C.; Oliveira, H. N. Genetic parameters and multi-trait genomic prediction for hemoparasites infection levels in cattle. **Livest. Sci.**, 273:105259, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2023.105259>.

Romero-Salas, D.; Mira, A.; Mosqueda, J.; García-Vázquez, Z.; Hidalgo-Ruiz, M.; Vela, N. A.; de León, A. A.; Florin-Christensen, M.; Schnittger, L. Molecular and serological detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in bovines and water buffaloes raised jointly

in an endemic field. **Vet. Parasitol.**, 217:101-107, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.12.030>.

Salinas-Estrella, E.; Amaro-Estrada, I.; Cobaxin-Cárdenas, M. E.; Preciado de la Torre, J. F.; Rodríguez, S. D. Bovine Anaplasmosis: Will there ever be an almighty effective vaccine? **Front. Vet. Sci.**, 9:946545, 2022. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.946545>.

Sangild, P. T.; Vonderohe, C.; Melendez Hebib, V.; Burrin, D. G. Potential benefits of bovine colostrum in pediatric nutrition and health. **Nutrients**, 13(8):2551, 2021. <https://doi.org/10.3390/nu13082551>.

Schares, G.; Peters, M.; Wurm, R.; Bärwald, A.; Conraths, F. J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. **Vet. Parasitol.**, 80(2):87-98, 1998. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00195-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00195-2).

Shahbazi, P.; Nouri Gharajalar, S.; Mohebbi, K.; Taeb, J.; Hashemzadeh Farhang, H.; Nikvand, A. A.; Norouzi, R. First Survey on the Presence and Distribution of Oxytetracycline-Resistance Genes in *Anaplasma* Species. **Acta Parasitol.**, 66(2):501-507, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11686-020-00306-y>.

Silveira, J. A.; Rabelo, E. M.; Ribeiro, M. F. Molecular detection of tick-borne pathogens of the family *Anaplasmataceae* in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). **Transbound. Emerg. Dis.**, 59(4):353-360, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01278.x>.

Silvestre, B. T.; Silveira, J. A. G.; Facury Filho, E. J.; Carvalho, A. U.; Versiani, A. F.; Estevam, L. T. M.; Ribeiro, M. F. B. Immune response and biochemistry of calves immunized with rMSP1a (*Anaplasma marginale*) using carbon nanotubes as carrier molecules. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, 27(2):191-202, 2018.

Silvestre, B. T.; Silveira, J. A. G.; Meneses, R. M.; Facury-Filho, E. J.; Carvalho, A. U.; Ribeiro, M. F. Identification of a vertically transmitted strain from *Anaplasma marginale* (UFMG3): Molecular and phylogenetic characterization, and evaluation of virulence. **Ticks Tick-borne Dis.**, 7(1):80-84, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.09.001>.

Smith, R. D. Epidemiology of babesiosis. In: *Malaria and Babesiosis: Research Findings and Control Measures* (M. Ristic, P. Ambroise-Thomas & J. P. Kreier, eds.), Martinus Nijhoff Publ., Boston, pp. 207-232, 1984.

Souza, R. S.; Resende, M. F. S.; Ferreira, L. C. A.; Ferraz, R. S.; Araújo, M. V. V.; Bastos, C. V.; Silveira, J. A. G.; Moreira, T. F.; Meneses, R. M.; Carvalho, A. U.; Leme, F. O. P.; Facury-Filho, E. J. Monitoring bovine tick fever on a dairy farm: an economic proposal for rational use of medications. **J. Dairy Sci.**, 104:5643-5651, 2021. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19504>.

Staley, T. E.; Bush, L. J. Receptor mechanisms of the neonatal intestine and their relationship to immunoglobulin absorption and disease. **J. Dairy Sci.**, 68(1):184-205, 1985. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80812-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80812-2).

Stokstad, M.; Niskanen, R.; Lindberg, A.; Thorén, P.; Belák, S.; Alenius, S.; Løken, T. Experimental infection of cows with bovine viral diarrhoea virus in early pregnancy - findings in serum and foetal fluids. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, 50(9):424-429, Nov 2003. <https://doi.org/10.1046/j.0931-1793.2003.00699.x>.

Swift, B. L.; Palmer, R. J. Vertical transmission of *Anaplasma marginale* in cattle. **Theriogenol.**, 6(5):515-519, 1976. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(76\)90119-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(76)90119-9).

Tagawa, M.; Yamakawa, K.; Aoki, T.; Matsumoto, K.; Ishii, M.; Inokuma, H. Effect of chronic hemoplasma infection on cattle productivity. **J. Vet. Med. Sci.**, 75:1271-1275, 2013. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0119>.

Teixeira, V. A.; Lana, A. M. Q.; Bresolin, T.; Tomich, T. R.; Souza, G. M.; Furlong, J.; Rodrigues, J. P. P.; Coelho, S. G.; Gonçalves, L. C.; Silveira, J. A. G.; Ferreira, L. D.; Facury-Filho, E. J.; Campos, M. M.; Dorea, J. R. R.; Pereira, L. G. R. Using rumination and activity data for early detection of anaplasmosis disease in dairy heifer calves. **J. Dairy Sci.**, 105(5):4421-4433, 2022. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20952>.

Tizard, I. R. **Imunologia Veterinária**, Trad. 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. GEN Guanabara Koogan, 2014.

Tristan, C.; Shahani, N.; Sedlak, T. W.; Sawa, A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. **Cell Signal.**, 23(2):317-323, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.08.003>.

Úsuga-Monroy, C.; Díaz, F. J.; Echeverri-Zuluaga, J.; González-Herrera, L. G.; López-Herrera, A. Presence of bovine leukemia virus in colostrum samples and its potential to infect newborn calves. **Chilean J. Agric. Anim. Sci.**, 37(2):167-176, 2021.

<https://doi.org/10.29393/CHJAAS37-19PBCA50019>.

Uyama, T.; Kelton, D. F.; Winder, C. B.; Dunn, J.; Goetz, H. M.; LeBlanc, S. J.; McClure, J. T.; Renaud, D. L. Colostrum management practices that improve the transfer of passive immunity in neonatal dairy calves: A scoping review. **PLoS ONE**, 17(6):e0269824, 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269824>.

Van Soest, B.; Cullens, F.; VandeHaar, M. J.; Nielsen, M. W. Short communication: Effects of transition milk and milk replacer supplemented with colostrum replacer on growth and health of dairy calves. **J. Dairy Sci.**, 103(12):12104-12108, 2020. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18361>.

Van Soest, B.; Nielsen, M. W.; Moeser, A. J.; Abuelo, A.; VandeHaar, M. J. Transition milk stimulates intestinal development of neonatal Holstein calves. **J. Dairy Sci.**, 105(8):7011-7022, 2022. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21723>.

Vieira, L. L.; Canever, M. F.; Cardozo, L. L.; Cardoso, C. P.; Herkenhoff, M. E.; Neto, A. T.; Vogel, C. I. G.; Miletti, L. C. Prevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, and *Babesia bigemina* in cattle in the Campos de Lages region, Santa Catarina state, Brazil, estimated by multiplex-PCR. **Parasite Epidemiol. Control**, 6:e00114, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00114>.

Vlasova, A. N.; Saif, L. J. Bovine Immunology: Implications for Dairy Cattle. **Front. Immunol.**, 12:643206, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.643206>.

Wamsley, H. L.; Alleman, A. R.; Johnson, C. M.; Barbet, A. F.; Abbott, J. R. Investigation of endothelial cells as an in vivo nidus of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Vet. Microbiol.**, 153(3-4):264-273, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.035>.

Wang, Y.; Wang, L.; Meng, M.; Huo, R.; Ma, N.; Chang, G.; Shen, X. High concentrate diet induced inflammatory response and tight junction disruption in the mammary gland of dairy cows. **Microb. Pathog.**, 176:105996, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.105996>.

Weather Spark. Disponível em: <https://pt.weatherspark.com/y/30411/Clima-caracter%C3%ADstico-em-Tr%C3%AAs-Cora%C3%A7%C3%B5es-Brasil-durante-o-ano>. Acesso em 03 de janeiro de 2024.

Wellnitz, O.; Zbinden, C.; Lüttgenau, J.; Bollwein, H.; Bruckmaier, R. M. Different chronological patterns of appearance of blood derived milk components during mastitis

indicate different mechanisms of transfer from blood into milk. **J. Dairy Res.**, 82:322-327, 2015. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000345>.

Wilson, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, 63(10):3741-3751, 1997. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997>.

Yasir M.; Al-Zahrani, I. A.; Khan, R.; Soliman, S. A.; Turkistani, S. A.; Alawi, M.; Azhar, E. I. Microbiological risk assessment and resistome analysis from shotgun metagenomics of bovine colostrum microbiome. **Saudi J. Biol. Sci.**, 31(4):103957, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2024.103957>.

Zaugg, J. L. Bovine anaplasmosis: Transplacental transmission as it relates to stage of gestation. **Am. J. Vet. Res.**, 46(3), 570-572, 1985. PMID: 3994125.

Zaugg, J. L.; Kuttler, K. L. Bovine anaplasmosis: In utero transmission and the immunologic significance of ingested colostrum antibodies. **Am. J. Vet. Res.**, 45(3):440-443, 1984. PMID: 6711971.

Zhang, Y.; Li, Y.; Cui, Y.; Wan, J.; Cao, S.; Jian, F.; Wang, R.; Zhang, L.; Ning, C. First molecular evidence for the presence of *Anaplasma* DNA in milk from sheep and goats in China. **Parasitol. Res.**, 115:2789-2795, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5028-z>.

Zigo, F.; Farkašová, Z.; Výrostková, J.; Regecová, I.; Ondrašovičová, S.; Vargová, M.; Sasáková, N.; Pecka-Kielb, E.; Bursová, Š.; Kiss, D. S. Dairy cows' udder pathogens and occurrence of virulence factors in staphylococci. **Animals**, 12(4):470, 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12040470>.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Investigação molecular de *Anaplasma marginale* em amostras de colostro bovino

Nome do pesquisador principal: Elias Jorge Facury Filho

Razão social e CiaeP instituição da CEUA: Universidade Federal de Minas Gerais – CiaeP: 02.044.2019.

Objetivos do estudo: O objetivo deste estudo é investigar a possível eliminação de *Anaplasma marginale* no colostro, uma vez que a produção de colostro envolve a passagem de diversos componentes biológicos da circulação sanguínea da fêmea gestante para a glândula mamária, inclusive hemácias, que são as células que podem ou não estar infectadas.

Procedimentos a serem realizados com os animais (n. de visitas, o que será realizado e quando, descrição do que será feito com os animais, etc.): Uma vez que a colostrogênese é iniciada, aproximadamente, na 5ª semana que antecede o parto, no pós-parto imediato esses animais serão amostrados (sangue e colostro) para tentativa de identificação do agente *A. marginale*. Para amostragem dos animais os procedimentos incluem coleta de sangue total, em tubo a vácuo contendo EDTA (5 mL) e soro, em tubo à vácuo sem conservante (10 mL). As coletas de sangue serão feitas via venopunção da veia coccígea, na parte inferior da cauda dos animais, logo após o parto. Antes de todas as coletas será feita antissepsia local com algodão, ou gaze, embebido em álcool 70°. A coleta de colostro será realizada após o manejo pré-ordenha protocolado pela fazenda. O pesquisador, calçando luvas de procedimento, irá higienizá-las com álcool 70°, higienizar as pontas dos tetos da vaca com algodão embebido em álcool 70° e proceder a ordenha de 10 mL de colostro de cada quarto mamário, formando uma amostra composta de 40 mL por animal. O colostro será coletado em tubo Falcon estéril de 50 mL. Para essas colheitas, os animais serão contidos em estação (todos os membros apoiados no solo), em suas respectivas baias individuais (coleta do pré-parto). Para coleta da amostra de colostro, as vacas recém-paridas serão contidas em tronco de manejo já utilizado pela fazenda para a ordenha do colostro. Os animais não serão sedados ou anestesiados, uma vez que esses manejos (ordenha e coleta de sangue) são pouco ou nada invasivos e comuns na rotina da fazenda.

Potenciais riscos para os animais: Não são esperadas eventualidades negativas inerentes aos procedimentos de coleta.

Cronograma: Espera-se que o projeto seja iniciado tão logo possua aprovação pelo CEUA-UFMG e estima-se que o tempo necessário para condução deste será de 4 meses, a partir da primeira coleta até a conclusão das análises de laboratoriais. O tempo foi estimado pela média de partos mensais, para que o n amostral possa ser contemplado com segurança. O cronograma se dará da seguinte forma:

Mês	Atividade
1º após aprovação	Coleta de sangue total, soro e colostro da fêmea bovina recém-parida
2º após aprovação	Análises laboratoriais
3º após aprovação	Análises laboratoriais
4º após aprovação	Análises laboratoriais

Benefícios: Espera-se.

Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares. O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será o(a) doutorando(a) Mayara Campos Lombardi, inscrito (a) no CRMV sob o n. MG 14.198. Além dele(a), a equipe do Pesquisador Principal Elias Jorge Facury Filho também se responsabilizará pelo bem-estar do (s) seu (s) animal (is) durante todo o estudo. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:

Equipe: Mayara Campos Lombardi, Júlia Angélica Gonçalves da Silveira, Camila de Valgas e Bastos Castro, Rodrigo Melo Meneses, Elias Jorge Facury Filho.

Endereço: Hospital Veterinário UFMG, Clínica de Ruminantes. Av. Pres. Ato. Carlos, 6627, São Luiz, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto. Responsável Geovanna Ribeiro Pereira Branquinho, sócia-proprietária e médica veterinária: [REDACTED]

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

(Belo Horizonte/MG), 29/06/2022

Assinatura do Responsável:

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Nome: Elias Jorge Facury Filho

Documento de Identidade (quando aplicável):

Identificação do(s) animal(is) (repetir tantas vezes quantas forem os animais)

Número de identificação: 01	Raça: Holandês ou Holandês x Gir
Espécie: Bovina	Nome: Não se aplica
Raça: Holandês ou Holandês x Gir	Número de identificação: 04
Nome: Não se aplica	Espécie: Bovina
Número de identificação: 02	Raça: Holandês ou Holandês x Gir
Espécie: Bovina	Nome: Não se aplica
Raça: Holandês ou Holandês x Gir	Número de identificação: 05
Nome: Não se aplica	Espécie: Bovina
Número de identificação: 03	Raça: Holandês ou Holandês x Gir
Espécie: Bovina	Nome: Não se aplica

APÊNDICE

Tabela 1A. Brix da amostra de origem, e concentração em ng/ μ L e razão de pureza A260/A280 de 76 amostras de DNA de colostro a partir de dois protocolos de processamento

Amostra	Protocolo 1 ²			Protocolo 2 ³	
	Brix ¹ (%)	ng/ μ L ⁴	A260/A280 ⁵	ng/ μ L	A260/A280
1	33,9	2,2	1,43	57,5	1,81
2	34,8	0,3	2,61	13,8	1,91
3	27,7	3,0	1,31	4,1	1,34
4	34,7	7,9	1,71	31,6	1,89
5	26,5	0,9	2,62	7,7	1,86
6	36,0	1,9	1,26	29,9	1,70
7	30,5	0,3	0,31	385,0	1,83
8	23,5	0,1	-0,39	34,7	0,81
9	25,1	0,5	2,72	2,4	0,91
10	25,5	9,0	2,40	4,3	2,01
11	29,5	10,7	1,83	16,1	1,80
12	33,0	-0,6	0,41	22,9	2,02
13	27,6	4,2	1,24	19,1	1,65
14	33,8	1,7	1,05	10,9	2,22
15	37,6	6,4	2,06	58,4	1,89
16	23,6	0,7	2,13	635,9	1,73
17	32,9	1,4	1,78	11,1	1,44
18	24,4	12,5	1,61	45,3	1,82
19	22,8	1,7	2,82	19,6	1,82
20	34,0	-0,1	-3,33	6,6	1,30
21	26,5	11,5	1,87	197,4	1,83
22	34,4	3,5	2,28	150,9	1,87
23	29,1	1,5	0,95	62,2	1,81
24	22,3	-0,7	1,57	5,5	2,43
25	27,3	0,2	-0,32	7,0	1,78
26	22,0	4,8	2,03	29,8	1,84
27	23,2	5,0	1,33	279,6	1,88
28	25,9	0,9	1,23	3,6	1,49
29	28,4	-0,2	1,14	1,7	0,66
30	24,7	5,6	2,71	2,6	0,88
31	34,3	0,4	0,58	4,7	1,72
32	23,6	0,8	2,03	11,6	1,81
33	34,2	2,6	1,49	92,4	1,80
34	36,0	4,7	1,70	20,6	1,63
35	23,2	0,3	0,68	11,5	1,88
36	24,0	0,2	20,37	8,7	1,68
37	31,9	2,0	1,59	15,0	1,49
38	25,8	7,6	3,21	8,9	1,52
39	21,7	-0,4	-1,46	50,4	1,67

40	18,9	-0,8	0,77	11,4	1,86
41	26,3	1,6	2,14	11,3	1,79
42	25,6	1,4	1,97	80,7	1,82
43	26,0	1,1	-3,54	166,4	1,75
44	23,4	0,2	0,28	24,4	2,25
45	27,3	6,7	1,96	22,9	1,91
46	27,3	2,4	2,09	27,1	1,46
47	21,7	-0,5	0,69	12,1	2,09
48	25,7	1,3	6,04	41,2	1,77
49	25,0	10,1	1,92	8,2	1,73
50	30,3	-0,5	45,27	19,9	1,72
21	31,6	2,8	1,69	3,0	1,51
52	30,5	1,1	0,73	8,0	2,11
53	32,3	-0,6	0,87	2,1	2,29
54	31,2	39,4	1,81	12,1	1,95
55	29,4	16,0	1,86	13,3	1,56
56	32,9	3,1	1,65	1,2	2,71
57	30,7	3,0	2,06	5,3	1,73
58	21,7	3,2	1,49	252,3	1,75
59	28,7	9,9	2,00	7,4	1,24
60	23,0	0,0	0,14	12,0	1,69
61	32,3	3,5	2,07	17,5	1,90
62	32,2	0,6	-3,60	7,6	1,31
63	28,2	2,9	1,26	12,9	1,66
64	26,7	44,5	1,83	558,9	1,86
65	25,7	6,9	1,64	199,1	1,84
66	39,2	16,8	1,90	17,9	1,65
67	25,8	7,3	1,84	618,1	1,80
68	38,0	6,2	1,90	69,7	1,88
69	32,6	5,1	0,87	8,4	0,89
70	29,0	456,9	1,82	354,7	1,72
71	26,0	-0,6	0,98	21,9	1,82
72	26,3	18,2	1,84	35,7	2,15
73	35,0	-0,7	0,72	9,7	2,08
74	29,0	2,8	2,87	34,0	2,16
75	20,9	0,2	0,63	3,1	2,91
76	25,5	-0,8	0,79	2,8	2,84

¹Brix: Grau brix (%) das amostras de colostro descongeladas, avaliado em refratômetro digital MISCO DD-3 (MISCO, USA);

²Protocolo 1: Realizada com solução comercial fisiológica NaCl 0,9%, centrifugadas a 25 °C;

³Protocolo 2: Realizado em duplicata, com solução de PBS 1x, centrifugadas a 5 °C;

⁴ ng/μL: Concentração, em ng/μL, avaliada em espectrofotômetro;

⁵A260/280: Razão de pureza, avaliada em espectrofotômetro.