

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO *ANAPLASMA MARGINALE* EM CONDIÇÕES DE
TRANSMISSÃO NATURAL**

Jenevaldo Barbosa da Silva
Médico Veterinário

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO *ANAPLASMA MARGINALE* EM CONDIÇÕES DE
TRANSMISSÃO NATURAL**

Jenevaldo Barbosa da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária, área: Medicina Veterinária Preventiva

2015

Silva, Jenevaldo Barbosa da
S586d Diversidade genética do *Anaplasma marginale* em condições de
transmissão natural / Jenevaldo Barbosa da Silva. -- Jaboticabal,
2015
xix, 89 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientadora: Rosangela Zacarias Machado
Banca examinadora: Marcos Rogério André, Alessandro de Mello
Varani, Mucio Flavio Barbosa Ribeiro, Itabajara da Silva Vaz Junior
Bibliografia

1. *Anaplasma marginale*. 2. Brasil. 3. Genótipo. 4. MSP1a. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.15:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JENEVALDO BARBOSA DA SILVA – Nascido na cidade de Varzelândia, Minas Gerais, em 26 de julho de 1984. Em 2009 Graduou-se em Médico Veterinário pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Durante o curso de graduação foi bolsista de Apoio Técnico nível médio entre os anos 2004 a 2005 e Iniciação Científica entre 2006 e 2009 pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Neste período participou de estudos referentes à epidemiologia dos helmintos, carrapatos e doenças transmitidas por carrapatos em animais domésticos. Concluiu o Mestrado no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinária, área de concentração em Sanidade Animal, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em fevereiro de 2012, com Dissertação intitulada de: “Análise dos fatores de risco relacionados à resistência ao *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e à resposta imune-humoral anti-*Anaplasma marginale* em bovinos leiteiros”, sob orientação do Prof. Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca. Neste período participou do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) entre a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e Universidade Federal do Pará (UFPA). Além disso, participou de um Programa de Cooperação Internacional financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) entre a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (BRASIL) e Universidad Agraria de La Habana (CUBA). Ingressou no curso de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp), Jaboticabal – SP, em março de 2012, sob orientação da Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado.

DEDICO

Aos meus pais, Elson Barbosa da Silva e Maria Ferreira da Silva, a minha noiva Gisele Maria Fagundes e ao meu filho João Lucas Fagundes da Silva, pela compreensão, carinho e incentivo em todos os anos da minha vida acadêmica. Agradeço pelos sacrifícios feitos na realização deste sonho!

OFEREÇO

Aos meus irmãos Benevaldo Barbosa da Silva, Dirceu Barbosa da Silva, Ivânia Aparecida Barbosa da Silva, Darci Lopes Barbosa da Silva, Luciana Barbosa da Silva e Elson Barbosa da Silva Júnior, pelo apoio incondicional.

"O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário" (Albert Einstein)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Professora Dra. Rosangela Zacarias Machado,
pelos ensinamentos, disponibilidade, generosidade,
paciência no dia a dia e, acima de tudo, por instigar
diariamente meu raciocínio científico.

“Grandes almas sempre encontram forte oposição de mentes medíocres” (Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir olhar para trás e perceber que nunca estive só e por ter sido meu porto seguro nos momentos difíceis da vida.

A minha família: Elson B. Silva, Maria F. Silva, Benevaldo B. Silva, Dirceu B. Silva, Ivânia A.B. Silva, Darci L.B. Silva, Luciana B. Silva e Elson B.S. Júnior pelo carinho e amor incondicional durante esta longa jornada.

A minha noiva Gisele M. Fagundes e família: José M. Fagundes, Maria S. Fagundes, Denise M. Fagundes e Marcelo O. Custódio pela paciência e apoio incondicional durante esta longa jornada.

À Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado, por ter me recebido de braços abertos e apoiado durante esses três anos de convívio na FCAV/UNESP.

Ao Prof. Dr. Marcos Rogério André pelo apoio incondicional, disponibilidade, ensinamentos e paciência que tornou prazerosa minha estadia no Laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP.

Ao Prof. Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca da UFRRJ e ao Dr. Charles Passos Rangel do IMA, pela amizade e ensinamento durante minha vida acadêmica.

A Pesq Dra. Rosane S.L. Fajardo (PESAGRO-RIO) e ao Médico Veterinário Mauricio Vital (FAZENDA GERMÂNIA), pelo apoio incondicional durante a pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária (FCAV/UNESP): Carla R. Freschi, Marcia M.G. Jusi, Mayra A.P. Figueiredo, Keyla C.M. Sousa, Paulo H. Sampaio, Otávio L.F. Júnior, Carlos A. Matos, Luiz R. Gonçalves, Aline R. Guerra, Rafaela Beraldo e Arvelino Jacinto pela amizade e ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ: Rafaella C. Teixeira, Bruna A. Baêta, Matheus D. Cordeiro, Carla C.D.U. Ribeiro, Priscilla N. Santos, Gustavo N.S. Castro, Patrícia B. Cepeda pela amizade, convivência e apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio-pesquisa (Processo 2012/21371-4) concedido para este projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado (2012-2015) concedida durante os três anos de curso.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da FCAV/UNESP pela disponibilidade e auxílio durante estes três anos de estudo.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Taxonomia do <i>A. marginale</i>	3
2.3. Transmissão do <i>A. marginale</i>	5
2.4. Distribuição e importância mundial do <i>A. marginale</i>	7
2.7. Imunopatologia da anaplasmoze bovina.....	13
2.8. Diversidade genética da MSP1a do <i>A. marginale</i>	14
2.9. Sequências repetidas da MSP1a do <i>A. marginale</i>	16
III. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos	19
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Área experimental	20
4.2. Delineamento do estudo	20
4.3. Colheitas de amostras	22
4.4. Volume globular	23
4.5. Avaliação da Riquetsemia por meio de esfregaço sanguíneo	23
4.6. Ensaio de Imunoadsorção enzimático indireto.....	23
4.7. Reação de imunofluorescência indireto	25
4.8. Extração de DNA	26
4.9. PCR em tempo real quantitativo para o gene <i>msp1b</i> do <i>A. marginale</i>	26

4.10. PCR e Semi-Nested PCR parao gene msp1a do <i>A. marginale</i>	27
4.11. Sequenciamento e análise dos produtos sequenciados	28
4.12. Variação na sequência de aminoácidos da MSP1a	29
4.13. Análise das sequências de DNA e classificação dos genótipos	29
V RESULTADOS.....	31
5.1. Frequência e riquetsemia do <i>A. marginale</i>	31
5.2. Análises das sequências MSP1a do <i>A. marginale</i>	34
5.3. Análises das mais frequentes sequências MSP1a do <i>A. marginale</i>	39
5.4. Análises filogenética da MSP1a do <i>A. marginale</i>	44
VI DISCUSSÃO	47
VII CONCLUSÕES	56
VIII. REFERÊNCIAS	57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Frequência de animais positivos (%) para *A. marginale* detectados por exame direto (Esfregação sanguíneo), teste sorológico (ELISA/RIFI) e análise molecular (qPCR) e valores médios do volume globular (hematócrito) em bezerras naturalmente infectadas na Pesagro-Rio, estados do Rio de Janeiro e Fazenda Germânia, estado de São Paulo, Brasil.**33**
- Tabela 2.** Organização das sequências repetidas da MSP1a das estirpes do *A. marginale* (número de acesso no GenBank KJ398348 - KJ398398) de bezerras da Pesagro-Rio, estados do Rio de Janeiro. A identificação das 19 diferentes estirpes do *A. marginale* foi baseada no Local/microssatélite/genótipo – (estrutura das sequências repetidas da MSP1a).**36**
- Tabela 3.** Novas sequências de repetições da MSP1a do *A. marginale* identificadas nos animais da Pesagro-Rio, estado do Rio de Janeiro e Fazenda Germânia, estado de São Paulo. O código de uma letra é usado para nomear os diferentes aminoácidos das sequências repetidas da MSP1a. Posições de aminoácidos com deleções/inserção (-) são mostradas. As novas sequências repetidas da MSP1a foram nomeadas de 165-186 na Pesagro-Rio e 190 Fazenda Germânia, seguindo proposto por de la Fuente et al. (2007) e atualizado por Cabezas-Cruz et al. (2013).**37**
- Tabela 4.** Organização das sequências repetidas da MSP1a das estirpes do *A. marginale* de bezerras da Fazenda Germânia, estados de São Paulo. A identificação das estirpes do *A. marginale* foi baseada no Local/microssatélite/genótipo – (estrutura das sequências repetidas da MSP1a).**37**

- Tabela 5.** Ocorrência das mais frequentes estirpes do *A. marginale* observadas em 60 diferentes amostras originadas de 40 bezerras. Todos os 40 animais foram avaliados pelo menos uma vez e no máximo quatro vezes. Os animais pertenciam à Fazenda Germânia, estado de São Paulo, e Pesagro-Rio, estado do Rio de Janeiro.....**40**
- Tabela 6.** A análise da sequência do microssatélite (Shine Dalgarno [GTAGG] – Códon de inicial [ATG]) da MSP1a em diferentes estirpes do *A. marginale* detectadas em animais de diferentes idades. Todas as sequências repetidas da MSP1a variaram de 1 para 6 em função da idade. O intervalo entre observações foi de três meses.....**41**
- Tabela 7.** Caracterização das sequências da MSP1a do *A. marginale*. As dez diferentes estirpes do *A. marginale* obtidas de bovinos são apresentadas neste estudo. Diferenças de aminoácidos entre sequências repetidas da MSP1a e posição em evolução por seleção negativa. O código de uma letra é utilizado para os diferentes aminoácidos das sequências repetidas da MSP1a. Posições de aminoácidos conservados estão destacadas com asteriscos.**42**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Bezerras mestiças (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) pertencentes ao rebanho bovino da Pesagro-Rio e da Fazenda Germânia, avaliados trimestralmente no estudo no período entre maio de 2012 a junho de 2014.**21**
- Figura 2.** Curva de amplificação (A) e curva padrão (B) da qPCR com oligonucleotídeos iniciadores para o gene *mps1b*. A curva padrão do número de ciclos (Ct) versus as diluições seriadas dos padrões com diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo a sequência-alvo ($2,0 \times 10^7$ cópias/ μL a $2,0 \times 10^0$ cópias/ μL). A figura apresenta os ciclos de amplificação da diluição seriada usando um controle padrão para quantificar as amostras infectadas por *A. marginale*.**34**
- Figura 3.** Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com Brometo de Etídeo. Os amplicómeros mostrados na foto são relativos à Semi-Nested-PCR para *A. marginale* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores 1733F/3134R e 2957R. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos); Canaleta 1: controle positivo; Canaletas 2, 3 e 7: amostra de bovinos negativos; Canaleta 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11: amostra de bovinos positivos; Canaleta 12: branco (água esterilizada ultra pura).**35**
- Figura 4.** Frequência de aminoácidos por posição nas sequências repetidas da MSP1a. A frequência de aminoácidos por posição nas sequências repetidas da MSP1a foi calculada pela fórmula de Variabilidade = número de aminoácidos diferentes em cada posição/frequência do mais comum aminoácido nesta posição. A primeira letra do nome do aminoácido foi

usada como código e o mais comum aminoácido por posição aparece colorido de cinza. PA*=Posição do Aminoácido43

Figura 5. Análise filogenética da sequência de aminoácidos da MSP1a das estirpes do *A. marginale* identificadas em bezerras, Pesagro-Rio, estado do Rio de Janeiro. O painel mostra a árvore consenso de análise filogenética ML e NJ. Os números acima dos ramos internos representam os valores de bootstrap (1000 repetições). Os números de acesso GenBank MSP1a das respectivas sequências utilizadas na árvore filogenética são mostrados. 44

Figura 6. Análise filogenética da sequência de aminoácidos da MSP1a das estirpes do *A. marginale* identificadas em bezerras, fazenda Germânia, estado de São Paulo. O painel mostra a árvore consenso de análise filogenética ML e NJ. Os números acima dos ramos internos representam os valores de bootstrap (1000 repetições). Os números de acesso GenBank MSP1a das respectivas sequências utilizadas na árvore filogenética são mostrados. 46

DIVERSIDADE GENÉTICA DO ANAPLASMA MARGINALE EM CONDIÇÕES DE TRANSMISSÃO NATURAL

RESUMO - *Anaplasma marginale* é o mais prevalente patógeno transmitido por carrapatos em bovinos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. A Proteína Principal de Superfície 1 alpha (MSP1a) do *A. marginale* contém um número variável de sequências repetidas na região animo-terminal e tem sido utilizada para a caracterização da diversidade genética desse patógeno. Nós realizamos um estudo longitudinal para averiguar a diversidade genética do *A. marginale* em um rebanho bovino leiteiro de Seropédica no estado do Rio de Janeiro e Taiacu no estado de São Paulo, Brasil. Vinte bezerras foram avaliadas a cada três meses durante o primeiro ano de vida por esfregaço sanguíneo, Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireta (ELISA), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Reação em Cadeia da Polimerase (nPCR/qPCR). Adicionalmente, as amostras positivas para o gene *msp1a* usando nPCR foram sequenciadas. A frequência do *A. marginale* variou de 10 - 90% no esfregaço sanguíneo, 20 - 80% no ELISA/RIFI e 15 - 100% na qPCR. O número de cópias da *msp1a* por mL de sangue variou de $1,04 \times 10^1$ a $6,76 \times 10^{12}$ (Seropédica RJ) e $1,20 \times 10^1$ a $5,17 \times 10^6$ (Taiacu SP). Os resultados mostraram que a diversidade genética do *A. marginale*, em um grupo de bezerras até 1 ano de idade em Taiacu (SP) foi baixa, com apenas três diferentes estirpes identificadas, mostrando o genótipo E. No entanto, os resultados mostraram que a diversidade genética do *A. marginale*, em um grupo de bezerras até 1 ano de idade em Seropédica (RJ) foi elevada, com dezenove diferentes estirpes identificadas, mostrando o genótipo E e G. As estirpes 4-63-27 (27.4%) e α - β^3 - Γ (77.8%) foram as mais comumente observadas em bezerras do estado do Rio de Janeiro e São Paulo, respectivamente. O novo conjunto de repetição da MSP1a 190 foi descrito em bezerras de Taiacu e vinte e uma repetições em tandem da MSP1a resultou em novas sequências com alterações de aminoácidos, que foram rotulados como 165-186 em bezerras de Seropédica. Em Seropédica, três animais nasceram infectados com as estirpes 4-63-27, 78-24²-25-31 e τ -10²-15, sugerindo a ocorrência de transmissão transplacentária. Em Taiacu, quatro animais infectados com a estirpe α - β^3 - Γ morreram, mostrando assim que esta estirpe também está envolvida em casos de anaplasnose clínica em Taiacu.

PALAVRAS-CHAVE: *Anaplasma marginale*, Brasil, Genótipo, MSP1a

GENETIC DIVERSITY OF *ANAPLASMA MARGINALE* UNDER NATURAL TRANSMISSION CONDITIONS

SUMMARY - *Anaplasma marginale* is the most prevalent tick-borne pathogen in cattle in tropical and subtropical regions of the world. The *A. marginale* major surface protein 1 alpha (MSP1a) contains a variable number of tandem repeats in the amino terminal region and has been used for the characterization of pathogen genetic diversity. We conducted a longitudinal study to ascertain the genetic diversity of *A. marginale* in a dairy cattle herd in Seropédica state of Rio de Janeiro and Taiaçu state of São Paulo, Brazil. Twenty calves were evaluated every three months during the first year of life by blood smear, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and Polymerase Chain Reaction (nPCR/qPCR). Additionally, samples positive for the *msp1a* gene using nPCR were sequenced. The prevalence of *A. marginale* ranged from 10 to 90% according to blood smears, 20-80% using ELISA/IFAT and 15-100% using qPCR. The number of *msp1a* copies per mL of blood ranged from $1,04 \times 10^1$ to 6.76×10^{12} (Seropédica RJ) and 1.20×10^1 to 5.17×10^6 (Taiaçu SP). The results showed that the genetic diversity of *A. marginale* in a group of calves up to 1 year of age from Taiaçu (SP) was low, with only three different strains identified, showing the microsatellite genotype E. However, the results showed that the genetic diversity of *A. marginale* in a group of calves up to 1 year of age from Seropédica (RJ) was high, with nineteen different strains identified, showing the microsatellite genotype E and G. The strains 4-63-27 (27.4%) and α - β^3 - Γ (77.8%) were the most commonly observed in calves of Seropédica RJ and Taiaçu SP, respectively. The new MSP1a tandem repeat 190 was described in calves from Taiaçu and twenty-two MSP1a tandem repeats resulted in new sequences with amino acid changes, which were labeled as 165-186 in calves from Seropédica. In Seropédica, three animals were born infected, with strains 4-63-27, 78-24²-25-31 and τ -10²-15, suggesting the occurrence of transplacental transmission. In Taiaçu, four animals infected with the α - β^3 - Γ strain died, showing that this strain is also involved in the clinical anaplasmosis cases.

KEYWORDS: *Anaplasma marginale*, Brazil, Genotype, MSP1a

I. INTRODUÇÃO

Anaplasma marginale (Rickettsiales: Anaplasmataceae) é o mais prevalente patógeno transmitido por carrapatos no mundo, distribuído nos seis continentes é responsável por alta morbidade e mortalidade em bovinos nas regiões temperadas, subtropicais e tropicais (KOCAN et al., 2010). *Anaplasma marginale* é uma bactéria intracelular obrigatória, podendo ser transmitida biologicamente por carrapatos, mecanicamente por moscas hematófagas e sangue infectado em fômites, e, menos comumente, por via transplacentária (AUBRY e GEALE, 2011).

O Brasil pode ser classificado como uma área de estabilidade endêmica para a ocorrência de anaplasmoze bovina, segundo critérios previamente estabelecidos para o sistema *Babesia bovis-Rhipicephalus (Boophilus) microplus* na Austrália por Mahoney e Ross em 1972. A prevalência sorológica do *A. marginale* no território brasileiro varia desde 16% no semiárido sergipano até valores próximos a 100% nos estados das regiões Sudeste e Sul. Porém, mesmo em rebanhos onde a soroprevalência é inferior a 75%, a circulação do *A. marginale* não é um indicativo de ocorrência de doença clínica nos animais. Assim, para compreensão adequada da situação epidemiológica da anaplasmoze bovina, além do acompanhamento sorológico periódico dos rebanhos, é necessária a caracterização molecular das diferentes estirpes do *A. marginale* circulantes no território nacional.

Anaplasma marginale possui mais de 20 proteínas capazes de induzirem imunidade protetora, sendo que algumas apresentam variação em sua estrutura molecular. Seis Proteínas Principais de Superfície (MSP) foram identificadas no *A. marginale* oriundo de eritrócitos bovinos e células de carrapatos. Três destas proteínas, MSP1a, MSP4 e MSP5, são codificadas cada uma por um único gene, e não variam antigenicamente dentre isolados, enquanto MSP1b, MSP2 e MSP3 são de famílias multigênicas e podem sofrer variação antigênica (KOCAN et al., 2003). A proteína MSP1 é um heterodímero composto de MSP1a (100 kDa) e MSP1b (105 kDa). Estas proteínas são estruturalmente não relacionadas e ligadas de forma não covalente (BARBET e ALLRED, 1991). MSP1a é expressa por um único gene polimórfico composta por uma região conservada e outra região variável contendo um número de unidades mutável de sequências repetidas. MSP1b é codificada por

uma família mutagénica composta por dois (*msp1b1* e *msp1b2*) e três (*msp1b1pg*, *msp1b2pg* e *msp1b3pg*) genes que parecem recombinar, aumentando a antigenicidade do patógeno.

MSP1a vem sendo utilizada na identificação molecular das diferentes estirpes do *A. marginale* por diferenças na massa molecular e sequência de aminoácidos. Enquanto a região C-terminal da proteína é altamente conservada, a N-terminal é altamente variável, com o número e a sequência de aminoácidos constante para uma determinada estirpe do *A. marginale* (DE LA FUENTE et al., 2001a). Baseada nesta classificação, a diversidade genética do *A. marginale* já foi descrita em rebanhos bovinos da Europa, África, Oriente Médio, América do Norte, América do Sul e Ásia. No Brasil, variações significativas nas sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale* foram mostradas em bovinos apenas nos estados do Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo.

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) propõe o uso de Imidocarb, Enrofloxacina e Oxitetraciclina para a eliminação de infecções persistentes por *A. marginale* em bovinos. Porém, estes antimicrobianos não têm sido capazes de eliminar as infecções persistentes causadas por *A. marginale*. Os animais com infecção persistente são clinicamente saudáveis, mas servem como reservatórios para transmissão do patógeno, sendo esses reservatórios necessários porque não há a transmissão transovariana da bactéria pelo carrapato vetor. Porém, não existem estudos que avaliem a capacidade dos antimicrobianos na seleção de estirpes do *A. marginale*. Além disso, embora MSP1a seja conservada e, o número e a sequência de aminoácidos mantêm-se constante em uma dada estirpe do *A. marginale*, a ocorrência de mutação nunca foi avaliada ao longo do tempo em animais mantidos em condições naturais. Assim, a presente pesquisa teve como objetivo conhecer, em um estudo longitudinal, a diversidade genética do *A. marginale* em um grupo de bezerras naturalmente infectadas, na Pesagro-Rio, localizada no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro e na Fazenda Germânia, localizada no município de Taiapu, estado de São Paulo, Brasil.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia do *A. marginale*

Anaplasma marginale pertence à ordem Rickettsiales. Os membros desta ordem são bactérias pequenas, obrigatoriamente intracelulares e tipicamente têm genomas pequenos (1,2-1,6 Mb) e circulares (BRAYTON et al., 2005). A ordem Rickettsiales foi reorganizada com base em análise dos genes 16S rRNA, groESL e MSPs, sendo os organismos designados em duas famílias: Anaplasmataceae e Rickettsiaceae (DUMLER et al., 2001). Dentro da família Anaplasmataceae, as análises filogenéticas foram consistentes para a formação de quatro gêneros geneticamente distintos: *Anaplasma* com similaridade mínima de 96,1%, *Ehrlichia* 97,7%, *Wolbachia* 95,6% e *Neorickettsia* 94,9% (DUMLER et al., 2001).

Atualmente o gênero *Anaplasma* é composto por seis espécies: *Anaplasma marginale* (espécie tipo), *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys* e *Anaplasma phagocytophilum* (DUMLER et al., 2001). Estes microrganismos são parasitas intracelulares obrigatórios, encontrados exclusivamente dentro de vacúolos ligados à membrana citoplasmática da célula do hospedeiro. Adicionalmente, quase todos os organismos designados à família Anaplasmataceae multiplicam-se tanto em hospedeiros vertebrados quanto em invertebrados (DUMLER et al., 2001).

A espécie *A. marginale* foi primeiramente descrita na África do Sul, como “pontos marginais” em eritrócitos de bovinos doentes (THEILER, 1910). As inclusões localizadas marginalmente foram observadas em células sanguíneas vermelhas de bovinos anêmicos (THEILER, 1911). Após as publicações de Theiler (1910-1911), a anaplasmoze bovina foi amplamente reconhecida na região tropical, subtropical e em muitas zonas temperadas do continente Europeu (KOCAN et al., 2010).

Smith e Kilborne (1893), em clássica publicação sobre os carrapatos como vetores da febre do Texas no gado, por engano concluíram que os "pontos marginais" observados nos eritrócitos dos bovinos anêmicos eram fases evolutivas do ciclo das babesias (KOCAN et al., 2010). Posteriormente, Theiler (1910) classificou a babesiose e a anaplasmoze como doenças distintas que podem coexistir no mesmo animal. No entanto, apenas em 1926, a coinfeção por *Babesia*

e *Anaplasma* foi reconhecida nos Estados Unidos durante a febre do Texas no gado (DARLINGTON, 1926). Posteriormente, observou-se que a anaplasmosose clínica ocorre com frequência em bovinos, mas outros ruminantes, incluindo búfalo d'água (*Bubalus bubalis*), búfalo Africano (*Syncerus caffer*), bison americano (*Bison bison*), veado-mula (*Odocoileus hemionus hemionus*), veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), veado-de-cauda-negra (*Odocoileus hemionus columbianus*) e alce-da-montanha (*Cervus elaphus nelsoni*) também podem ser infectados (KUTTLER et al., 1984; ZAUNGG et al., 1996).

2.2. Ciclo biológico do *A. marginale*

O ciclo de vida do *A. marginale* segue o ciclo alimentar do carrapato vetor (KOCAN, 1986). Durante o repasto sanguíneo, os eritrócitos dos bovinos infectados são ingeridos pelo carrapato, promovendo a infecção das células intestinais. Após o desenvolvimento do *A. marginale* nas células do intestino médio do carrapato, muitos outros tecidos são infectados, incluindo a glândula salivar, pela qual o patógeno é transmitido, durante a alimentação, para outros bovinos (KOCAN, 1986; KOCAN et al., 1992a, b). Em cada sítio de infecção no carrapato, *A. marginale*, em forma vegetativa, se desenvolve dentro de vacúolos ou colônias, multiplica-se por divisão binária, desenvolvendo-se até a forma infectante denominada de corpúsculo denso (KOCAN et al., 1992a, b). A sobrevivência dos corpúsculos densos em eritrócitos fora dos hospedeiros permite que ocorra além da transmissão biológica, a transmissão mecânica por dípteros hematófagos e fômites contaminados (KOCAN et al., 2010; AUBRY e GEALE, 2011). No carrapato, a primeira forma do *A. marginale* observada dentro da colônia é a reticulada (vegetativa) que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que podem conter centenas de organismos. A forma reticulada, em seguida, muda para a forma densa, sendo que esta forma infectante pode sobreviver fora das células do hospedeiro por um período limitado de tempo (KOCAN et al., 2010).

Nos bovinos o período de incubação varia de 7 a 60 dias, sendo em média 28 dias, onde a dose infectante é determinante para essa variação temporal (KOCAN et al., 2010). Uma vez no sangue do animal, o organismo penetra no eritrócito, invaginando a membrana celular de modo a formar um vacúolo, dividindo-se e

formando um corpúsculo de inclusão contendo até oito corpúsculos iniciais. Após a infecção, o número de eritrócitos infectados aumenta geometricamente. Eritrócitos infectados são posteriormente fagocitados pelas células retículo-endoteliais, resultando no desenvolvimento de anemia, hemoglobinemia, hemoglobinúria, febre, perda de peso, aborto, letargia e icterícia, levando, muitas vezes, a morte em animais com mais de dois anos (RISTIC, 1977). Bovinos que sobrevivem à infecção aguda desenvolvem infecção persistente, caracterizada por níveis baixos de riquetsemia cíclica, possibilitando a transmissão do agente para outros carrapatos (KIESER et al., 1990; KOCAN et al., 2010).

2.3. Transmissão do *A. marginale*

A transmissão do *A. marginale* pode ser efetuada mecanicamente por moscas hematófagas ou fômites contaminados com sangue, biologicamente por carrapatos e, menos comumente, por via transplacentária (PALMER et al., 2000; KOCAN et al., 2004; AUBRY e GEALE, 2011). A transmissão biológica por carrapatos parece ser mais eficiente do que a transmissão mecânica por moscas (SCOLES et al., 2005). No entanto, algumas estirpes do *A. marginale* não são infectantes para carrapatos, não sendo transmitidas pela forma biológica (KOCAN et al., 2004).

A transmissão mecânica pode ocorrer por fômites contaminados com sangue, incluindo agulhas, serras de descornas, pinças de nariz, instrumentos de tatuagem, dispositivos para brincos auriculares e instrumentos de castração (KOCAN et al., 2010). A transmissão mecânica por artrópodes tem sido relatada em dípteros hematófagos, principalmente dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys* (EWING, 1981). Varias estirpes do *A. marginale* que não são transmissíveis por carrapatos *Dermacentor* foram relatadas nos estados da Flórida e Illinois, Estados Unidos (SMITH et al., 1986; DE LA FUENTE et al., 2001b; SCOLES et al., 2006). Assim, a transmissão mecânica é provavelmente a rota principal de infecção dos bovinos por *A. marginale* em determinadas áreas dos Estados Unidos, América Central, América do Sul e África onde vetores carrapatos estão ausentes (EWING, 1981).

A transmissão biológica do *A. marginale* é efetuada por cerca de 20 espécies de carrapatos (DIKMANS, 1950; EWING, 1981; KOCAN et al., 2004). Os principais vetores biológicos do *A. marginale* são os carrapatos dos gêneros *Dermacentor* spp.

em áreas temperadas e *Rhipicephalus* spp. nos trópicos, embora muitas outras espécies possam estar envolvidas na transmissão (KOCAN et al., 2004). A competência do vetor para transmissão do *A. marginale* pode variar entre as diferentes espécies de carrapatos (GUGLIELMONE, 1995; SCOLES et al., 2005). As estirpes do *A. marginale* naturalmente transmitidas por *R. (B.) microplus* em áreas tropicais são geneticamente distintas das estirpes comumente transmitidas por *Dermacentor andersoni* em regiões temperadas (FUTSE et al., 2003; SCOLES et al., 2007). O número de organismos na glândula salivar após a alimentação e a capacidade de transmissão da estirpe Porto Rico é significativamente superior no *R. (B.) microplus* quando comparado com *D. andersoni*. Em contraste, um número superior da estirpe St. Maries multiplicou-se na glândula salivar e é transmitida por *D. andersoni* quando comparado com *R. (B.) microplus*. Como a replicação e desenvolvimento do patógeno dentro da glândula salivar são os principais determinantes da transmissão, a adaptação de uma determinada estirpe do *A. marginale* para um vetor disponível em uma determinada área geográfica, resultando no aumento da replicação, proporcionando ao patógeno uma vantagem competitiva em regiões endêmicas, onde existem numerosas estirpes do *A. marginale* (NICHOLLS et al., 1980).

A transmissão biológica do *A. marginale* pode ocorrer de duas formas distintas, transestadial (a partir de um estágio para outro) e intraestadial (dentro da mesma fase) (KOCAN et al., 1992a, b). A transmissão transestadial do *A. marginale* foi mostrada em carrapatos de três hospedeiros (*D. andersoni* e *D. variabilis*) nos Estados Unidos e África do Sul (*Rhipicephalus (Boophilus) simus*) e carrapatos de um hospedeiro (*Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*) em Israel, América Central, América do Sul e México (KOCAN et al., 2003). A transmissão intra-estadial é realizada por carrapatos adultos machos quando se deslocam de um hospedeiro para outro. Assim, os carrapatos machos podem desempenhar um papel importante na transmissão biológica do *A. marginale*, pois são persistentemente infectados com o patógeno e podem transmitir a rickettsia repetidamente por se deslocarem de um animal a outro e terem um período de vida superior aos das fêmeas (KOCAN et al., 1992a, b).

A transmissão transplacentária do *A. marginale* pode ocorrer quando vacas desenvolvem anaplasnose aguda durante a gestação (ZAUGG e KUTTLER, 1984) ou condições de constantes reinfecções em áreas endêmicas (POTGIETER e VANRENSBURG, 1987). Portanto, a transmissão transplacentária do *A. marginale* pode contribuir para a epidemiologia desta doença em algumas regiões (POTGIETER e VANRENSBURG, 1987; KOCAN et al., 2003). Estudos já sugeriram a ocorrência de transmissão transplacentária do *A. marginale* no Brasil (GRAU et al., 2013; POHL et al., 2013), porém, não existem dados referentes à importância da transmissão transplacentária sobre a prevalência global da doença nos rebanhos bovinos de uma determinada área geográfica.

2.4. Distribuição e importância mundial do *A. marginale*

Anaplasma marginale é o mais prevalente patógeno transmitido por carrapatos no mundo. Distribuído nos seis continentes, é responsável por alta morbidade e mortalidade em bovinos nas regiões temperadas, subtropicais e tropicais do mundo (KOCAN et al., 2010). A distribuição epidemiológica do *A. marginale* envolve diferentes fatores que permanecem obscuros, principalmente aspectos relacionados à transmissão em condições naturais (GUGLIELMONE, 1995). A rickettsia está presente nos Estados Unidos e na Europa, é endêmico na Ásia, na África, no Caribe e na América Latina, com exceção das zonas desérticas e montanhosas, como os Andes (GUGLIELMONE, 1995). Porém, a distribuição da anaplasnose está em constante alteração devido à tendência do aquecimento global, o que influencia o movimento dos carrapatos vetores (JONSSON e REID, 2000).

A relação entre a população de vetores com a anaplasnose bovina gera três situações epidemiológicas distintas: a primeira é observada nas regiões onde há uma flutuação sazonal na população de vetores, que pode ser devida às condições climáticas ou pode ser provocada por estratégias inadequadas no controle de ectoparasitas (ARAÚJO et al., 2003). Nestas condições, quando os animais estão por um longo período sem contato com o patógeno e são expostos, apresentam sintomatologia clínica aguda, com altas taxas de mortalidade. Nestes casos, a situação é típica de instabilidade enzoótica (RIBEIRO et al., 1984; OLIVEIRA et al.,

1992). A segunda situação ocorre em áreas onde a população de vetores está presente durante o ano todo. Nestas regiões, os animais apresentam maior resistência à infecção, pois desenvolvem imunidade nos primeiros meses de vida, ao serem infectados por *A. marginale* quando ainda estão protegidos pelos anticorpos colostrais, e passam ao estado de portadores (ARAÚJO et al., 2003). Esta situação caracteriza áreas de estabilidade enzoótica, onde não são esperados surtos, nem altas taxas de mortalidade em animais adultos (RIBEIRO e REIS, 1981). A terceira situação ocorre em áreas marginais, onde as condições climáticas não são totalmente favoráveis ao desenvolvimento do carrapato, porém, possibilitam a ocorrência de infestações temporárias em população de risco (ARAÚJO et al., 2003).

A situação epidemiológica da anaplasmose bovina, na maioria das regiões brasileiras é de estabilidade enzoótica (ARAÚJO et al., 2003). Porém, a prevalência sorológica do *A. marginale* no território brasileiro pode variar desde 16,3% no semiárido sergipano (OLIVEIRA et al., 1992) até valores próximos a 100% nos estados de Minas Gerais, Paraíba, Bahia, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (RIBEIRO e REIS, 1981; MADRUGA et al., 1994; ARAÚJO et al., 1995; VIDOTTO et al., 1995; SOUZA et al., 2001; ANDRADE et al., 2004). Na Austrália, observou-se que, quando mais de 75% dos bezerros com idade inferior a nove meses de vida foram expostos a carrapatos *R. (B.) microplus* infectados com *B. bovis*, não ocorriam casos clínicos de babesiose no rebanho (MAHONEY e ROSS, 1972). Posteriormente esse conceito foi ampliado para todos os patógenos transmitidos por carrapatos e para todas as regiões do mundo. No entanto, a associação entre a prevalência do *A. marginale* e ocorrências de doença clínica e/ou mortalidade é mais complexa do que foi previamente estabelecido para o sistema *R. (B.) microplus-B. bovis* (JONSSON et al., 2012).

A anaplasmose bovina provoca perda econômica importante na maioria dos países endêmicos, principalmente devido à alta morbidade e mortalidade em rebanhos suscetíveis (KOCAN et al., 2003). As perdas devido à anaplasmose são decorrentes do baixo ganho de peso, redução da produção de leite, aborto, gasto com tratamento e mortalidade (KOCAN et al., 2003). No entanto, poucos estudos foram realizados para estimar as perdas decorrentes da anaplasmose em um país.

Nos Estados Unidos, onde a anaplasnose ocorre na forma de surtos de casos agudo e superagudos da doença, as perdas anuais em bovinos de corte resultantes da morbidade e mortalidade são estimadas em US\$ 300 milhões, enquanto que na América Latina, onde a anaplasnose ocorre predominantemente na forma crônica e ocasionalmente aguda, essas perdas foram calculadas em US\$ 875 milhões (KOCAN et al., 2003).

2.5. Susceptibilidade de bezerros ao *A. marginale*

Os bezerros são menos suscetíveis à infecção por *A. marginale* e, quando infectados, são menos suscetíveis à doença clínica (KOCAN et al., 2003). Este fenômeno não é bem compreendido, mas a remoção do baço em bezerros recém-nascidos os torna totalmente suscetível à infecção, e à anaplasnose nestes animais é muitas vezes mais grave do que a observada em bovinos adultos (KOCAN et al., 2003). A primeira imunidade de bezerros recém-nascidos frente aos agentes infecciosos é fornecida por anticorpos colostrais, os quais constituem um importante fator para o estabelecimento do equilíbrio parasito-hospedeiro. Anticorpos maternos contra *A. marginale* em bezerros desaparecem totalmente após 9 a 12 meses de vida (POTGIETER e STOLTZ, 1994).

No Brasil, a maioria das áreas pecuárias é caracterizada como de ocorrência da anaplasnose bovina (ARAÚJO et al., 1998). Nestas áreas, bezerros são infectados pela primeira vez durante os primeiros meses de vida, quando em geral, os animais encontram-se protegidos pelos anticorpos colostrais. Porém, o manejo adotado nas propriedades, sobretudo as leiteiras, tem favorecido a ocorrência de anaplasnose nos bezerros (OLIVEIRA et al., 1992; MELO et al., 2001). A falha na transferência da imunidade passiva, ou mesmo o declínio natural dos anticorpos colostrais, associados às altas infestações por carrapatos e moscas, são fatores que devem ser considerados para a ocorrência de anaplasnose neste período (MADRUGA et al., 1985; RIBEIRO et al., 2003).

No estado de Minas Gerais, ao observar o curso natural da anaplasnose em bezerros criados semi-estabulados verificou-se que todos se tornaram infectados em torno de 62 dias de idade (RIBEIRO et al., 1984). Os anticorpos colostrais persistiram por um período variável de 12 a 40 dias, com todos os animais

apresentando riquetemia, sendo que a metade apresentou sinais clínicos e cura clínica espontânea (RIBEIRO et al., 1984). No estado do Mato Grosso do Sul, Madruga et al. (1985) observaram que, três dias após o nascimento 36% dos bezerros foram soronegativos para *A. marginale*, com redução para 13.3% aos 15 dias de vida. As primeiras riquetsemias foram observadas a partir dos 30 dias de idade, sugerindo que a primeira infecção ocorre nos primeiros dias de vida. Neste mesmo estudo, as maiores riquetsemias foram observadas entre 60 e 120 dias de vida. No estado de Minas Gerais, Melo et al. (2001) mostraram que 90% dos bezerros possuíam anticorpos anti-*A. marginale* antes dos 30 dias de idade, sendo que, dos três aos cinco meses estes valores caíam até um mínimo de 13,6% e a partir dos seis meses de idade, por conta da primeira infecção, 96% tornavam-se positivos novamente.

Os níveis de anticorpos colostrais transferidos diminuem do segundo ao quarto mês de idade, sendo que após o sexto mês todos os animais apresentam altos níveis de anticorpos para *A. marginale*, correspondendo à presença de carrapatos infectados com *A. marginale* (MADRUGA et al., 1985). Adicionalmente, Herrero et al. (1998) mostraram que 79% dos bezerros apresentam anticorpos colostrais no nascimento, diminuindo para 13% no primeiro mês. Assim, quando as fêmeas gestantes são naturalmente expostas ao *A. marginale* e não ocorrem falhas na passagem de anticorpos colostrais, os bezerros tornam-se imunes durante os primeiros dias de vida. Porém, a exposição dos bezerros à baixa carga do patógeno neste período é fundamental, pois propiciará o desenvolvimento de imunidade ativa sem a ocorrência de doença clínica.

2.6. Importância dos animais adultos na manutenção do *A. marginale*

Anaplasma marginale é transmitido por carrapatos ixodídeos infectados aos bovinos imunologicamente suscetíveis (PALMER, 1989). As rickettsias invadem eritrócitos maduros e se replicam intracelularmente por divisão binária. A infecção torna-se microscopicamente detectável quando a riquetsemia ultrapassa 10^7 organismos por mL de sangue. Sinais agudos da doença ocorrem à medida que aumenta a riquetsemia para 10^9 mL⁻¹, com 10 a 70% do total de eritrócitos infectados (PALMER, 1989). Os indivíduos que sobrevivem à doença aguda

permanecem persistentemente infectados por anos com níveis rickettsêmicos microscopicamente indetectáveis de 10^2 a 10^7 mL⁻¹ (ERIKS et al., 1989).

A persistência da infecção ao longo da vida é fundamental para a transmissão contínua do *A. marginale*, visto que não ocorre transmissão transovariana no carrapato. A habilidade do *A. marginale* em causar infecção persistente é propiciada pela capacidade das proteínas de membrana externa realizarem variação antigênica, escapando assim do sistema imune do hospedeiro (PALMER et al., 1999). A manutenção de uma população de carrapatos infectados é dependente de um reservatório animal infectado (PALMER et al., 1999). Assim, a infecção dos carrapatos pela alimentação em animais persistentemente infectados parece ser relativamente eficiente, onde mais de 50% dos carrapatos tornam-se infectados após a alimentação (ERIKS et al., 1993). Embora a taxa de infecção do carrapato se correlacione com o nível de ricketsemia durante a alimentação, uma porcentagem significativa de carrapatos se tornar infectada, mesmo quando se alimentam em animais com níveis baixos de ricketsemia (ERIKS et al., 1993). Além disso, o mesmo número de corpúsculos do *A. marginale* desenvolve-se na glândula salivar dos carrapatos na transmissão subsequente, independentemente se os carrapatos foram infectados durante a alta ou baixa ricketsemia nos bovinos (PALMER et al., 2000).

Anaplasma marginale possui a capacidade de permanecer em hospedeiros imunocompetentes (PALMER et al., 1999). Animais com infecção persistente são protegidos contra altos níveis rickettsêmicos e doença clínica após o desafio com estirpe homóloga (PALMER, 1989; PALMER et al., 1999). A resposta imune ao *A. marginale* é eficaz no controle da doença quando o animal é desafiado com doses acima de 10^8 rickettsias por mL. No entanto, o animal não consegue eliminar a infecção persistente de baixo nível rickettsêmico, sugerindo que essa persistência envolva um mecanismo de escape do patógeno à resposta imune do hospedeiro (PALMER et al., 2000).

A infecção de eritrócitos maduros por *A. marginale* elimina a possibilidade de que a persistência da infecção seja unicamente devido à proteção contra a resposta imune na célula hospedeira, pois a vida média dos eritrócitos de bovinos de 160 dias implica na emergência contínua e re-infecção de novas hemácias para manter a infecção. Assim, a infecção persistente deve ser um processo dinâmico

caracterizado pela contínua invasão de eritrócitos e replicação (PALMER et al., 2000). A identificação de ciclos repetidos de riquetsemias, cada um com aumento progressivo de organismos, seguido de uma diminuição abrupta, levou à hipótese de que a persistência da infecção reflete o surgimento sequencial e o controle imune de variantes antigênicas (KIESER et al., 1990).

As principais proteínas de superfície (MSP) foram as primeiras a serem identificadas no *A. marginale* com base em sua abundância e capacidade de induzir resposta imune (ARAÚJO et al., 2003). Entre as proteínas de superfície, MSP2 está envolvida na interação com células do hospedeiro vertebrado e invertebrado (PALMER et al., 2000), sendo um possível mecanismo para a infecção de novos hospedeiros ou estabelecimento da infecção persistente do *A. marginale* (UETI et al., 2012). A riquetsemia aguda após a transmissão do *A. marginale* é caracterizada pela expressão de duas diferentes proteínas de membrana externa, as variantes ARV1 e ARV2 da MSP2 (RURANGIRWA et al., 1999). No entanto, a riquetsemia persistente resultante é composta por organismos que não expressam ARV1 ou ARV2, mas são caracterizadas por novos tipos variantes de MSP2 (RURANGIRWA et al., 1999). Estes achados suportam a hipótese de que a variação antigênica, ao invés de uma resposta imune ineficiente, é responsável pela infecção persistente do *A. marginale*. A relevância da variação antigênica das MSP2 para infecção persistente do *A. marginale* é apoiada pelas seguintes observações: i) as variantes estruturais únicas surgem em cada ciclo de riquetsemia persistente; ii) os epítomos variantes específicos de células B codificados pela região hipervariável são expressos em cada ciclo, e iii) a resposta imune específica para MSP2 está associada à eliminação do parasita (PALMER et al., 2000).

A eficácia da infecção de carrapatos e o desenvolvimento de níveis elevados de formas infectantes do *A. marginale* nas glândulas salivares, juntamente com a longevidade da riquetsemia, possuem um papel fundamental para a infecção persistente e transmissão contínua (PALMER et al., 2000). Assim, a definição da importância de bovinos com infecção persistente do *A. marginale* é fundamental para a compreensão das determinantes essenciais da transmissão.

2.7. Imunopatologia da anaplasmosose bovina

Estudos realizados por Palmer (1989), Palmer et al. (1999), Brown et al. (1998) e Brown et al. (2001b) forneceram informações relevantes sobre a natureza da resposta imune de bovinos frente à infecção por *A. marginale*, bem como a identificação de antígenos que possam desempenhar um papel na resposta imune protetora. A resposta imune ao *A. marginale* envolve tanto a imunidade humoral quanto a imunidade celular. Apesar da importância dos anticorpos na resposta imune contra *A. marginale*, é improvável que, isoladamente, esses sejam capazes de proteger os bovinos contra o *A. marginale* (BROWN et al., 2001b). Dessa forma, torna-se evidente a importância da resposta celular, a qual envolve a participação de linfócitos T auxiliares (CD4+), produtores de interferon- γ (IFN- γ) (BROWN et al., 1998). O IFN- γ ativa macrófagos, aumentando a produção de óxido nítrico (NO), substância que tem ação tóxica sobre a rickettsia (BROWN et al., 1998). Além disso, IFN- γ atua sobre linfócitos B, estimulando a produção de IgG2 (ESTES et al., 1994). Esse isotipo de imunoglobulina apresenta maior capacidade de promover fagocitose por meio de opsonização do que a IgG1 (MCGUIRE et al., 1979), estando provavelmente envolvido no processo de neutralização da infectividade dos corpúsculos iniciais do *A. marginale* mediada por anticorpos (TUO et al., 2002). Assim, a imunização contra *A. marginale* induz a produção de anticorpos contra epítomos de superfície em combinação com a ativação de macrófagos que fagocitam eritrócitos parasitados e eliminam o patógeno (PALMER, 1989). A peça central deste modelo é o linfócito T CD4+ expressando INF- γ , o que aumenta a síntese predominantemente da subclasse de imunoglobulina IgG2 e concomitantemente ativa os macrófagos para aumentar a expressão do receptores para células B, fagocitose, fusão fagolisossomal e liberação de NO (PALMER, 1989).

A infecção de bovinos com *A. marginale* não resulta em alteração no número de leucócitos circulantes, incluindo linfócitos, e a imunossupressão generalizada também não tem sido relatada (PALMER et al., 1999). Esta importante observação sugere que, apesar dos altos níveis rickettsêmicos e títulos de anticorpos IgG específicos para *A. marginale*, a resposta por célula T é difícil de ser detectada no sangue periférico (PALMER et al., 1999). Isso ocorre porque, embora *A. marginale*

induza a proliferação de linfócitos no baço de bovinos infectados, neste mesmo momento a resposta no sangue periférico não é detectável (GALE et al., 1996).

A indução da resposta imune utilizando purificado de MSPs impede a riquetsemia por *A. marginale* após o desafio (BROWN et al., 1998). No entanto, bezerras esplenectomizadas foram resistentes à anaplasnose aguda depois que linfócitos T CD4⁺ foram seletivamente exauridos por tratamento com anticorpos monoclonais anti-CD4 (VALDEZ et al., 2002). Assim, apesar dos linfócitos T CD4⁺ desempenharem um papel na infecção por *A. marginale*, a resposta de anticorpos parece ser essencial para a defesa bem sucedida contra o parasita.

2.8. Diversidade genética da MSP1a do *A. marginale*

Desde o principio da era genômica em meados da década de 1990, o estudo da biologia dos patógenos tem sido beneficiado pela riqueza de informações proporcionadas pelo conhecimento dos genomas bacterianos (BRYANT et al., 2012). O sequenciamento completo do genoma permite identificar as alterações genéticas que caracterizam a adaptação dos patógenos bacterianos a seus hospedeiros e ambientes. *Anaplasma marginale* tem um genoma circular e pequeno (1,2 a 1,6 Mb), já sendo descritas sequências de diferentes isolados geográficos, as quais mostram um elevado grau de variação (BRAYTON et al., 2005; PIERLÉ et al., 2014). O genoma da estirpe St. Maries do *A. marginale*, EUA, possui 1.197.687 pb (BRAYTON et al., 2005). Dentre as 949 sequências codificantes anotadas neste genoma, 62 foram previstas para expressar proteínas da membrana externa, e destas, 49 pertencentes ao grupo das Proteínas Principais de Superfície 1 (MSP1) e a superfamílias de MSP2 (BRAYTON et al., 2005).

Anaplasma marginale possui mais de 20 proteínas que induzem imunidade protetora, sendo algumas capazes de realizar variação em sua estrutura molecular (KOCAN et al., 2010). Seis Proteínas Principais de Superfície (MSP) foram identificadas no *A. marginale* oriundos de eritrócitos bovinos e células de carrapatos. Três destas proteínas, MSP1a, MSP4 e MSP5, são de genes individuais, e não variam antigenicamente dentre os isolados, enquanto MSP1b, MSP2 e MSP3 são de famílias multigênicas e podem variar antigenicamente (KOCAN et al., 2003). MSP1 é um heterodímero composto de MSP1a (100 kDa) e MSP1b (105 kDa). Estas

proteínas são estruturalmente não relacionadas e ligadas de forma não covalente (BARBET e ALLRED, 1991). MSP1a é formado por um único gene polimórfico composta por uma região conservada e outra região variável contendo um número de unidades mutável de sequências repetidas (ALLRED et al., 1990). MSP1b é codificada por uma família mutagénica composto por dois genes (*m*sp1b1 e *m*sp1b2) e três genes (*m*sp1b1pg, *m*sp1b2pg e *m*sp1b3pg) que parecem recombinar, aumentando a antigenicidade do patógeno (BARBET e ALLRED, 1991).

MSP1a é uma adesina para eritrócitos e células no intestino de carrapatos, enquanto MSP1b apenas para eritrócitos de bovinos (MCGAREY e ALLRED, 1994; MCGAREY et al., 1994, DE LA FUENTE et al., 2001b, c). A região variável da MSP1a contém epítomos para célula B altamente imunogênicos além de estimular a produção de anticorpos monoclonais específicos para neutralizar a infecção nos eritrócitos (PALMER et al., 2000; BLOUIN et al., 2002). Além disso, MSP1a também contém epítomos de células Th1 na região conservada que pode estar envolvida na imunoproteção (BROWN et al., 2001a). A função de adesina em MSP1a está localizado na região variável e a comparação das sequências repetidas da MSP1a de estirpes, a partir de isolados geográficos, mostrou não ter associação entre a transmissão por carrapatos e o tipo ou o número de repetições presentes dentro desta região (DE LA FUENTE et al., 2001b, 2003, 2007; ALMAZÁN et al., 2008).

MSP1a tem sido utilizada na identificação das estirpes geográficas por diferenças na massa molecular e sequência de aminoácidos (DE LA FUENTE et al., 2007). Essa proteína é altamente conservada e, o número e a sequência de aminoácidos mantêm-se constante em uma dada estirpe do *A. marginale* (ALLRED et al., 1990; DE LA FUENTE et al., 2001a, b). Baseado nesta classificação, a diversidade genética do *A. marginale* foi descrita em rebanhos bovinos da Europa (DE LA FUENTE et al., 2005a), África (MTSHALI et al., 2007; MUTSHEMBELE et al. 2014), Oriente Médio (MOLAD et al., 2009), América do Norte (PALMER et al., 2001; ALAMZAN et al., 2008), América do Sul (GARCIA-GARCIA et al., 2004; RUYBAL et al., 2009) e Ásia (YBAÑEZ et al., 2014). No Brasil, variações significativas nas sequências repetidas da MSP1a das estirpes do *A. marginale* foram observadas apenas em bovinos dos estados do Paraná (VIDOTTO et al.,

2006), Minas Gerais (DE LA FUENTE et al., 2005b; POHL et al. 2013), Rio de Janeiro (SILVA et al., 2015a) e São Paulo (SILVA et al. 2015b).

2.9. Sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale*

MSP1a é um polipeptídeo contendo um grupo amino-terminal decapeptídeo precedido de uma região com um número variável de 23-29 aminoácidos, seguido por um domínio da proteína altamente conservada (DE LA FUENTE et al., 2001a). Esta região de sequências repetidas da MSP1a, que contém epítomos sensíveis para neutralização (PALMER et al., 2000) e também funciona como uma adesina para os receptores da célula do hospedeiro, é constituída quase que exclusivamente de segmentos de cadeia β , o que é consistente com uma região altamente hidrofílica (KNELLER et al., 1990). O restante da proteína é composto principalmente de estrutura α -helicoidal (KNELLER et al., 1990).

O número de sequências repetidas da MSP1a em isolados geográficos do *A. marginale* varia de um a dez (DE LA FUENTE et al., 2007; CABEZAS-CRUZ et al., 2013). Dentro destas repetições da MSP1a, o número de posições dos nucleotídeos e aminoácidos em que isolados geográficos diferem é maior na primeira do que nas sequências repetidas subsequentes. Enquanto a primeira repetição tem uma variação de 16 aminoácidos para 29 posições, o número de aminoácidos variando entre isolados geográficos para a segunda e última repetição é de 7 e 9, respectivamente (CABEZAS-CRUZ et al., 2013).

Entre isolados geográficos, sequências repetidas MSP1a localizadas entre a primeira e última repetição, para isolados com quatro ou mais repetições, são altamente conservadas, com uma ou nenhuma variação nas posições dos aminoácidos (DE LA FUENTE et al., 2001a; DE LA FUENTE et al., 2007). Quando a sequência da primeira repetição no isolado de Oklahoma foi comparada com as sequências posteriores, na segunda repetição apenas em duas posições ocorreram alterações e cinco na terceira repetição (DE LA FUENTE et al., 2001a). Uma exceção a esta tendência pode ser a estrutura da MSP1a relatado por Palmer et al. (2001) a partir de um rebanho bovino no leste do Oregon, EUA, nos quais *A. marginale* era endêmica. Embora os autores tenham observado apenas um genótipo em bovinos infectados, a população do *A. marginale* foi geneticamente heterogênea

para as sequências da MSP1a entre os indivíduos de uma mesma população (PALMER et al., 2001). A origem desta heterogeneidade genética é desconhecida, mas reflete uma população com alta diversidade genética (DE LA FUENTE et al., 2001a). A explicação mais aceitável para essa heterogeneidade da população do *A. marginale* é que a diversidade resulta de processos distintos de transmissão, cada um introduzindo genótipos distintos da MSP1a no rebanho, que posteriormente são mantidas por transmissão mecânica ou biológica (PALMER et al., 2001).

A diversidade genética não resulta em evolução, a menos que uma variante com maior aptidão surja em condições que promovam o desequilíbrio e favoreça a evolução aleatória rápida (DE LA FUENTE et al., 2001a). Assim, sequências do tipo selvagem ou sequência mestre, nessa situação permanecem inalteradas (DE LA FUENTE et al., 1999). Uma estirpe do *A. marginale* foi estabelecida por animal, mas diferentes estirpes sobreviveram e foram transmitidos, indicando a não ocorrência de seleção para variantes específicas, ou processo de "exclusão genética", operado ao nível do parasita e impedindo o estabelecimento de mais de um genótipo por indivíduo animal (DE LA FUENTE et al., 1999).

As sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale* posicionaram-se dentro da região com maior mutabilidade (DE LA FUENTE et al., 2001a). Descobriu-se que a frequência de aminoácidos nas posições variáveis dentre isolados geográficos foi maior nesta região do que no resto da proteína (BOWIE et al., 2002). Em contraste, as regiões antigênicas (BOWIE et al., 2002) localizaram-se em domínios intracelulares putativos, e a parte da proteína exposta extracelular apresentou baixa antigenicidade. A baixa antigenicidade desta parte da MSP1a, que afeta a adesão do *A. marginale* a receptores da célula hospedeira, pode representar um mecanismo envolvido na manutenção de infecções persistentes, em que *A. marginale* evita a resposta imune, mantendo a capacidade para infectar as células (DE LA FUENTE et al., 2001a). Assim, torna-se importante caracterizar as sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale* porque essas parecem ter funções importantes na capacidade do *A. marginale* para infectar células hospedeiras em carrapatos, ou ainda, as repetições em série podem ter outras funções que não foram ainda descritas (ALLRED et al., 1990; DE LA FUENTE et al., 2001a; CABEZAS-CRUZ et al., 2013).

O modelo da origem e evolução das sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale* leva em conta a função biológica desta região da proteína (DE LA FUENTE et al., 2007). Esse modelo propõe que a pressão seletiva exercida pela interação entre parasita e hospedeiro durante a evolução, particularmente entre o carrapato e o patógeno, resulta na manutenção de sequências relativamente conservadas nas repetições internas da proteína. Esse mecanismo preserva a função da MSP1a do *A. marginale* em aderir e invadir as células e ao mesmo tempo, permite o acúmulo de mutações na primeira e na última repetição e, a função necessária para a funcionalidade da proteína (DE LA FUENTE et al., 2001a). A primeira e última repetição da MSP1a, além de estarem envolvidas na interação entre o carrapato e o parasita, também pode conferir a especificidade para o vetor (DE LA FUENTE et al., 2001a), sendo que os peptídeos da primeira e da última repetição podem co-evoluir com o vetor (DE LA FUENTE et al., 2001a). Assim, a hipótese é que (i) repetições internas medeiam as interações entre ligante e receptor com forte pressão de seleção, resultando em uma maior homogeneidade entre isolados e, portanto, associação mais estreita com a transmissão biológica do *A. marginale* por carrapatos, e (ii) a primeira e a última repetição participam das interações entre o carrapato e o parasita, conferindo especificidade para o vetor, e, por conseguinte, co-evoluem com o vetor (DE LA FUENTE et al., 2001a).

O número variável de sequências repetidas na MSP1a sugere que a duplicação destas sequências devido à recombinação homóloga pode ocorrer como possíveis “testes” para propiciar vantagens competitivas às diferentes estirpes do *A. marginale* (MUTSHEMBELE et al., 2014). Assim, um rebanho pode ser infectado por diversas estirpes do *A. marginale*, sendo algumas mais e outras menos adaptadas ao hospedeiro. Porém, embora algumas estirpes do *A. marginale* possam ser mais prevalentes nos rebanhos, isso por si só, não é indicativo de processo evolutivo ou seleção. Assim, três possibilidades podem ser consideradas a fim de explicar a alta diversidade genética do *A. marginale* em um rebanho: (1) elevada população de vetores; (2) comércio de bovinos entre regiões endêmicas; (3) rebanhos infectados por longos períodos por *A. marginale* resultará em alta diversidade genética (DE LA FUENTE et al., 2007).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar, por meio de um estudo longitudinal, a diversidade genética da MSP1a do *A. marginale* em bezerras naturalmente infectadas pertencentes aos rebanhos bovinos da Pesagro-Rio, município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro, e da fazenda Germânia, município de Taiapuá, estado de São Paulo, Brasil.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar a detecção direta por esfregaço sanguíneo, Semi-Nested-PCR e qPCR e, indireta por ELISA e RIFI do *A. marginale* em bezerras, a cada três meses, desde o nascimento até um ano de idade;
- Realizar a detecção de transmissão transplacentária do *A. marginale* em bezerras recém-nascidas por esfregaço sanguíneo, nPCR e qPCR;
- Estimar a riquettsemia do *A. marginale* por qPCR nas bezerras a cada três meses, desde o nascimento até um ano de idade;
- Caracterizar os diferentes genótipos e estirpes do *A. marginale* capazes de realizar transmissão transplacentária;
- Conhecer a diversidade genética da MSP1a do *A. marginale* em bezerras avaliadas trimestralmente do nascimento até um ano de idade;
- Comparar as diferentes situações da anaplasmoose bovina observada nos rebanhos bovinos da Pesagro-Rio e fazenda Germânia;
- Estimar por qPCR a riquettsemia absoluta para cada uma das diferentes estirpes do *A. marginale* detectadas nas bezerras;
- Comparar filogeneticamente as estirpes do *A. marginale* identificadas das deste estudo.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área experimental

Foram utilizados animais provenientes de duas propriedades leiteiras localizadas em áreas endêmicas para *A. marginale*. As propriedades foram previamente selecionadas tendo como base a ocorrência ou não de casos clínicos de anaplasmose nos anos anteriores ao estudo. À Fazenda Germânia, localizada na cidade de Taiaçu, estado de São Paulo (latitude 21° 15' sul, longitude 48° 29' oeste e altitude de 735 metros) foi selecionada com base em casos clínicos e mortalidade de bezerras decorrentes da anaplasmose bovina (comunicação pessoal de R.Z. Machado, 2010-2012). À Fazenda Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, cidade de Seropédica, estado do Rio de Janeiro (latitude sul 22° 48' sul, longitude oeste 43° 41' e altitude de 33m) foi selecionada com base em observações anteriores da circulação do *A. marginale*, porém com ausência de casos clínicos de anaplasmose (SILVA et al., 2014).

4.2. Delineamento do estudo

Foram realizados dois estudos longitudinais. Na Pesagro-Rio os animais foram avaliados no período de maio de 2012 a maio de 2013. Essa região é caracterizada por duas estações distintas. No período seco (Abril a Setembro) a média da temperatura é de 23 °C e a precipitação de 170 mm e no período chuvoso (Outubro a Março) 26 °C e a precipitação de 1320 mm. Na Fazenda Germânia os animais foram avaliados no período de junho de 2013 a junho de 2014. Essa região é caracterizada por duas estações distintas. No período seco (Abril a Setembro) a média da temperatura é de 20,9 °C e a precipitação de 180 mm e no período chuvoso (Outubro a Março) 24,4 °C e a precipitação de 1122 mm.

Os animais foram avaliados trimestralmente, do nascimento aos 12 meses de idade. A primeira colheita de sangue dos animais foi realizada logo após a ingestão do colostro materno, porém não mais que uma hora após o nascimento. Assim, um total de 40 bezerras (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), sendo 20 pertencentes à Fazenda Germânia e 20 à Pesagro-Rio (Figura 1).



Figura 1. Bezerras mestiças (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) pertencentes ao rebanho bovino da Pesagro-Rio e da Fazenda Germânia, avaliados trimestralmente no estudo no período entre maio de 2012 a junho de 2014.

O manejo dos animais foi semelhante nas duas propriedades. Assim, em ambas as propriedades as bezerras receberam colostro logo após o nascimento. Sempre que possível, as bezerras recebiam o colostro da própria mãe, porém, em algumas ocasiões, recorria-se a um banco de colostro existente nas propriedades. Após o nascimento, os animais foram mantidos alojados em baias individuais, tendo acesso à uma área com pastagem a partir dos 15 dias de vida até os dois meses de idade. Neste período os animais recebiam 4,0 kg de leite divididos em duas vezes no dia. Dos dois aos seis meses, as bezerras foram mantidas durante o dia em uma área de pastagem e recolhidas a noite para baias coletivas. Entre os sete e os 12 meses de idade, as bezerras foram transferidas para uma área de pastejo continua onde permaneceram durante o dia e a noite.

Na Pesagro-Rio, as bezerras receberam, trimestralmente, IVOMECC® (Ivermectin, 1 mg/kg, Merial, Brasil) e levamisole (10 mg/kg, Ripercoll®, Fort Dodge, Brazil) para o controle de helmintos. O sistema de controle do carrapato *R. (B.) microplus* adotado para os animais adultos consistia no fornecimento de sal mineral contendo DIFLY S3® (Diflubenzuron, Champion, Brasil) diariamente no cocho. Neste sistema, em nenhum momento do estudo, as bezerras receberam medicação específica contra hemoparasitos.

Na Fazenda Germânia as bezerras receberam, trimestralmente, IVOMECC® (Ivermectin, 1 mg/kg, Merial, Brasil) e levamisole (10 mg/kg, Ripercoll®, Fort Dodge, Brazil) para o controle de helmintos. Para o controle de carrapatos os animais recebiam mensalmente cypermethrin (150 mg/kg, Colosso®, Ourofino, Brazil). O controle de hemoparasitos foi realizado nos animais que manifestaram sinais clínicos de anaplasmosose e/ou babesiose e consistiu na administração de TERRAMICINA® (Oxitetraciclina, 20 mg/kg, Ouro Fino, Brasil) e IMIZOL® (Dipropionato de imidocarb, 2,1 mg/kg, Bayer, Brasil). Devido à alta incidência de animais com sinais clínicos para anaplasmosose, como protocolo, os animais recebiam tratamento preventivo contra esse agente no 24º dia de vida. Alguns animais da propriedade apresentaram sinais clínicos de anaplasmosose mais de uma vez durante a vida, sendo tratado sempre com os mesmos medicamentos.

4.3. Colheitas de amostras

Foram colhidas duas amostras de sangue diretamente da veia jugular de cada um dos animais avaliados. O soro sanguíneo obtido com tubos sem anticoagulante foi utilizado para a realização do Ensaio de Imunoadsorção Enzimático Indireto (ELISAI) e da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). O sangue total colhido em tubo com anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) foi utilizado para a dosagem do volume globular, esfregaço sanguíneo e extração de DNA para posterior realização da reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e quantificação absoluta da riquetsemia (qPCR).

4.4. Volume globular

O volume globular de todos os bezerros foi determinado pela técnica de micro hematócrito (DOUGLAS e WARDROP, 2010). Os tubos capilares foram preenchidos com amostra de sangue de cada bovino, as extremidades não preenchidas foram seladas com massa de moldar e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm durante cinco minutos. Posteriormente, os valores de hematócrito foram determinados com o auxílio de uma escala de micro hematócrito. Foram considerados normais os animais com volume globular entre 28% e 46% e animal anêmico quando o volume globular foi inferior a 28% (DOUGLAS e WARDROP, 2010).

4.5. Avaliação da Riquetsemia por meio de esfregaço sanguíneo

Colheu-se sangue periférico a partir da punção de capilar marginal de ponta de orelha dos animais para confecção de esfregaços sanguíneos finos, os quais foram fixados pelo Metanol (Synth®, São Paulo, SP) durante 3 minutos e corados pelo Giemsa (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) durante 40 minutos. A determinação da positividade da amostra foi realizada pela leitura de campos homogêneos do esfregaço sanguíneo, utilizando microscópio de luz (Olympus BX40) com objetiva de imersão de 100X, buscando a presença de corpúsculos de inclusão do *A. marginale*.

Os níveis riquetsêmicos nas bezerras naturalmente infectadas foram determinados por meio de esfregaços sanguíneos corados. O esfregaço sanguíneo, corado com Giemsa, foi examinado para a identificação da presença intra-eritrocítica do *A. marginale* baseado na morfologia (THEILER 1910, 1911). As células infectadas foram contadas em 20 campos aleatoriamente selecionados (250–300 células por campo) em microscópio, e o número de células positivas foi calculado em valores percentuais. Foi considerado animal infectado por *A. marginale*, todo aquele que apresentou resultado de volume globular inferior a 28% (DOUGLAS e WARDROP, 2010) e riquetsemia igual ou superior a 0.01% (RIBEIRO e REIS, 1981).

4.6. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireta

Uma estirpe do *A. marginale* [Número de acesso no Genbank KJ398398] isolada em um bezerro em Jaboticabal no Estado de São Paulo, Brasil (R.Z.

MACHADO em 1997, comunicação pessoal) e mantida criopreservada em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi utilizada para a produção de antígeno. Um bezerro de três meses de idade esplenectomizado foi inoculado com 4,0 mL de sangue com riquetsemia de 40%, contendo a estirpe Jaboticabal do *A. marginale*. No 17º dia de infecção, 200 mL de sangue do bezerro com riquetsemia de 20% foi colhido para inocular no em um segundo bezerro também esplenectomizado. O segundo bezerro mostrou parasitêmia de 40% entre o 5º e 7º dia após a infecção. Assim, o sangue foi colhido e processado para a produção de antígeno semipurificado para a realização do ELISA teste (MACHADO et al., 1997).

Para detecção dos níveis de anticorpos da classe IgG anti-*A. marginale* dos bovinos, amostras de soro sanguíneo foram submetidas ao ELISA-indireto segundo protocolo descrito por Machado et al. (1997) para *B. bovis* e adaptado para *A. marginale* por Andrade et al. (2004) e Silva et al. (2015a). O ELISA-teste indireto foi estabelecido por titulação em blocos, à concentração ótima do antígeno do *A. marginale* de 10-12 $\mu\text{g/mL}$.

Foram utilizados 100 μL de antígeno total do *A. marginale* diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9,6, em cada poço da placa de ELISA (Maxisorp®; Nunc, Thermo Scientific, Brasil). Para a sensibilização as placas foram seladas e incubadas por 12 horas à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, as placas foram bloqueadas com 200 μL de tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,6, adicionado de 5% de leite em pó desnatado (Molico®, Nestle, Brasil), e incubadas por 90 minutos à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, em câmara úmida. Após três lavagens com tampão PBS-Tween (fosfato salina, pH 7,2 e Tween 20 a 5%), foram adicionados à placa de ELISA 100 μL de soro bovino diluídos em PBS-Tween 20 (1:200) com 5% de leite em pó desnatado. As placas foram incubadas à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em câmara úmida por 90 minutos, e em seguida, lavadas com PBS-Tween 20 por três vezes. Uma alíquota de 100 μL de conjugado IgG de coelho anti-IgG de bovino, marcada com fosfatase alcalina (Número de catálogo A0705, Sigma, St. Louis, MO), diluída a 1:25.000 em PBS-Tween e acrescida de 5% de leite em pó desnatado, foi adicionada em cada poço e incubada por 90 minutos à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por fim, realizaram-se três lavagens com PBS-Tween 20, adicionou-se o substrato de enzima fosfatase alcalina p-nitrofenil fosfato (Sigma, St. Louis, MO) diluído a 1mg/ml em tampão dietanolamina (Sigma, St. Louis, MO), pH 9,8, e as placas

seladas foram incubadas por 45 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi determinada a absorvância em espectrofotômetro de microplacas (MRX TC Plus, Dynex Technology), filtro de 405nm. O ponto de corte foi estabelecido de acordo com a escala de nível do ELISA (NE) anteriormente definido por Machado et al. (1997), ou seja, os níveis de anticorpos de valor diagnóstico ($NE \geq 3$) foram considerados positivos dentro do intervalo de densidade óptica de 0,310 a 0,417. Nessas condições, a menor densidade óptica dos soros negativos foi de $0,90 \pm 0,013$ e a maior densidade óptica verificada para os soros de referência positiva foi de $1,03 \pm 0,065$.

4.7. Reação de Imunofluorescência Indireta

O antígeno do *A. marginale* usado para confecção de lâminas de RIFI foi obtido a partir de bezerros experimentalmente infectados com a estirpe do *A. marginale* [Número de acesso no Genbank KJ398398] isolada em um bezerro em Jaboticabal no Estado de São Paulo, Brasil (R.Z. MACHADO em 1997) e mantida criopreservada em nitrogênio líquido a -196°C . As amostras de soros de bovinos foram diluídas a 1:80 em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2 (130 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 5,6 mM Na_2HPO_4 ; 1,0 mM KH_2PO_4 ; 0,8 mM NaH_2PO_4). Foram depositados 10 μL do soro diluído em cada poço das lâminas contendo antígenos do *A. marginale*. Soros de bovinos controles positivos e negativos para *A. marginale* foram utilizados em cada lâmina. As lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos, em câmara úmida. Posteriormente, foram lavadas em solução salina de fosfato tamponada, PBS pH 7,2, secas e em cada poço foram adicionados 10 μL de conjugado (Número do catalogo F7887, anti-IgG de bovino, marcado pelo isotocianato de fluoresceína), na diluição 1:200, conforme orientação do fabricante (Sigma, St. Louis, MO). A lâmina foi então incubada por mais 30 minutos a 37°C , em câmara úmida. Procedeu-se novamente três lavagens consecutivas por cinco minutos e secagem; As lâminas foram então montadas entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada e, em seguida, foram avaliadas em microscópio equipado com luz ultravioleta em aumento de 40x. A positividade da reação implicou na observação de fluorescência nos corpúsculos de inclusão, comparativamente a amostras de soro controles positivo e negativo (ANDRADE et al., 2004).

4.8. Extração de DNA

O DNA foi extraído das amostras de sangue das bezerras amostradas utilizando o QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Madison, Estados Unidos). A concentração do DNA e a relação 260/280 obtida de cada amostra foi realizada utilizando o espectrofotômetro tipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos). Após a extração e dosagem da concentração, o DNA foi armazenado a -20 °C para realização da PCR. A concentração média e o desvio padrão do DNA das amostras foram: $26,7 \pm 4,9$. O valor médio e o desvio padrão da relação 260/280 foram: $0,86 \pm 0,28$.

4.9. PCR em tempo real quantitativo para o gene *msp1b* do *A. marginale*

A reação de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) foi realizada segundo descrito por Carelli et al. (2007), com modificações para o gene *msp1 β* . A qPCR foi realizada seguindo as recomendações técnicas do MIQE (Informação Mínima para Publicação de Experimentos com PCR em Tempo Real Quantitativo). A reação foi realizada com volume final de mistura de 10 μ L, contendo 1 μ L de DNA genômico, 5,0 μ L de TaqMan[®] Gen Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 10 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador (AM forward: 5'-TTGGCAAGGCAGCAGCTT 3' e AM-inversa: 5'-TTCCGCGAGCATGTGCAT-3') e 10 μ M da sonda de hidrólise (AM-sonda: 6FAM-5'-TCGGTCTAACATCTCCAGGCTTTCAT-3'-BHQ1). Os ciclos foram realizados sob as seguintes condições: 2 min/50 °C, 10 min/95 °C e 40 ciclos de 15seg/95 °C e 1 min/60 °C. As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador CFX96 Thermal Cycler[®] (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos). Todas as amostras foram testadas em triplicatas. A quantificação do número de cópias de DNA-alvo/ μ L foi realizada com a utilização do plasmídeo pSMART (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, EUA) contendo a sequência alvo de 95 bp para amplificação do DNA do *A. marginale* (gene *msp1 β*).

A eficiência da reação foi calculada por meio de uma curva padrão obtido a partir de diluições seriadas do DNA plasmidial contendo a sequência-alvo. Para isso, diluições seriadas foram feitas a fim de construir uma curva padrão com diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo a sequência-alvo ($2,0 \times 10^7$ cópias/ μ L a

$2,0 \times 10^0$ cópias/ μL). O número de cópias de plasmídeos foi determinado de acordo com a fórmula $(\text{Xg}/\mu\text{L DNA}/[\text{tamanho do plasmídeo (pb)} \times 660]) \times 6.022 \times 10^{23} \times$ cópias do plasmídeo/ μL . Água esterilizada ultra pura (Qiagen, Madison, Estados Unidos) e DNA obtido a partir de amostras de sangue de bovinos negativos para *A. marginale* foram utilizados como controle-negativos da reação.

4.10. PCR e Semi-Nested PCR para o gene *msp1a* do *A. marginale*

Para amplificação de um fragmento do gene *msp1a* do *A. marginale* foram utilizados os protocolos descritos por de la Fuente et al. (2001c) e Lew et al. (2002). Para ambos os protocolos, a primeira reação foi conduzida com um volume final de 25 μL de mistura, contendo 5 μL de DNA genômico, 12,5 μL de PCR Master Mix (Qiagen, Madison, Estados Unidos), 6,5 μL de água ultra pura e 1,6 μM de concentração de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores. Posteriormente, na segunda reação, foi utilizado um volume final de 25 μL de mistura, sendo 1 μL de DNA genômico amplificado na primeira reação, 12,5 μL de PCR Master Mix (Qiagen, Madison, Estados Unidos), 10,5 μL de água ultra pura e 1,6 μM de cada oligonucleotídeo iniciador.

Na Semi-Nested-PCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 1733F (5'-TGTGCTTATGGCAGACATTTCC-3'), 3134R (5'-TCACGGTCAAACCTT TGCTTACC-3') e 2957R (5-'AAACCTTGTAGCCCCAACTTATCC-3') (LEW et al., 2002). Na primeira reação foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 1733F e 3134R e, na segunda reação, os oligonucleotídeos iniciadores 1733F e 2957R. A reação de Semi-Nested-PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C durante 5 minutos, 40 ciclos a 94 °C 30 segundos, 1 minuto a 55 °C e 2 minutos a 72 °C, seguido de uma extensão final de 7 minutos a 72 °C. As mesmas condições foram utilizadas no segundo ciclo de amplificação, exceto que a temperatura de anelamento foi alterada para 60 °C. Na PCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores MSP1aP: 5'-GCATTACAACGCAACGCTTGAG-3' e MSP1a3: 5'-GCTTTACGCCGCCGCTG CGCC-3' (DE LA FUENTE et al., 2001c). A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C durante 30 segundos, 35 ciclos a 94 °C 30 segundos e 2,5 minutos a 68 °C.

Os produtos amplificados (aproximadamente 900 pares de base em ambos os protocolos) foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% corado com Brometo de Etídeo (0,625 $\mu\text{L}/\text{mL}$) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 100 V/350mA durante 55 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos). Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Chemi-Doc, BioRad®).

4.11. Sequenciamento e análise dos produtos sequenciados

Após a PCR/Semi-Nested-PCR, os produtos amplificados foram purificados utilizando o Sílica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do material purificado foi realizada em aparelho espectrofotômetro Nano Drop 2000c (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). O sequenciamento dos produtos amplificados nos dois sentidos foi realizado por meio de método automatizado baseado na terminação da cadeia por dideoxynucleotídeos (SANGER et al., 1977). O sequenciamento foi conduzido em sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO). Todas as amostras foram sequenciadas três vezes para maior veracidade das sequências. O sequenciamento utilizando o método de Sanger produz sequências de no máximo 900 pb com qualidade Phred 20. O programa CAP3 [<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>] foi utilizado para a obtenção da sequência consenso. Posteriormente, as sequências consenso foram submetidas ao programa BLAST [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>], a fim de verificar a identidade das sequências obtidas com aquelas depositadas no banco de dados GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] (ALTSCHUL et al., 1990). A análise filogenética foi realizada como se segue: sequências de nucleotídeos foram alinhadas com o MUSCLE (v3.7) configurado para alta precisão (EDGAR, 2004; KATOH e

STANDLEY, 2013) e as regiões ambíguas foram removidos com Gblocks (v0.91b) (CASTRESANA, 2000). A árvore filogenética foi construída usando o método de máxima verossimilhança implementado nos programas PhyML (alrt v3.0) (GUINDON e GASCUEL, 2003, ANISIMOVA e GASCUEL, 2006) e PHYLIP (v3.66) (FELSENSTEIN, 1989). A confiança para o ramo interno foi avaliada através do método de “bootstrapping” (100 réplicas de “bootstrap”). A representação gráfica e edição da árvore filogenética foram realizadas com TreeDyn (v198.3) (CHEVENET et al., 2006).

4.12. Variação na sequência de aminoácidos da MSP1a

As sequências de nucleotídeos foram traduzidas para aminoácidos com o auxílio da ferramenta de tradução ExPaSy [<http://web.expasy.org/translate/>] do Instituto Suíço de Bioinformática. As sequências repetidas da MSP1a foram alinhadas usando o CLUSTALW2 [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>], e a posição dos aminoácidos foram numeradas de 1 a 29. A variabilidade de aminoácidos foi determinada usando a fórmula: Variabilidade = número de aminoácidos diferentes numa dada posição / frequência do aminoácido mais comum nessa posição (KINDT et al., 2007). Assim, a variabilidade era igual ao número de aminoácidos diferentes numa dada posição/frequência do aminoácido mais comum nessa posição (DE LA FUENTE et al., 2007). A análise foi realizada considerando que as duas regiões poderiam ser delineadas por caracteres geográficos.

4.13. Análise das sequências de DNA e classificação dos genótipos

Para análise da diversidade genética e análise filogenética foram incluídas neste estudo as estirpes do *A. marginale* disponibilizadas no GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] que possuíam sequências repetidas da MSP1a já conhecidas (CABEZAS-CRUZ et al., 2013). Um microssatélite foi localizado na MSP1a 5'UTR entre a sequência putativa de Shine-Dalgarno (GTAGG) e o códon de iniciação da tradução (ATG) (DE LA FUENTE et al., 2001a). A estrutura do microssatélite foi GTAGG (G/A TTT) m (GT) n T ATG (ESTRADA-PEÑA et al., 2009). A análise de sequências repetidas da MSP1a foi realizada segundo a nomenclatura proposta por de la Fuente et al. (2007). A distância SD-ATG foi

calculada segundo a fórmula $(4 \times m) + (2 \times n) + 1$ descrita por Estrada-Peña et al. (2009). Por esta fórmula foi possível obter o número de nucleotídeos e posteriormente classificar as amostras em genótipos, segundo critérios descritos por de la Fuente et al. (2002).

A Variação dos aminoácidos por posição (GARCIA-BORONAT et al., 2008) foi calculada usando a fórmula de Shannon entropia (SHANNON, 1948) segundo o site [<http://imed.med.ucm.es/>]:

$$H = - \sum_{i=1}^M P_i \log_2 P_i$$

Onde P_i é a fração de resíduos com um certo tipo de aminoácido i , e M é o número de um determinado tipo de aminoácido por posição. A proporção de aminoácidos variáveis ao longo das posições conservadas da MSP1a foi calculada como o número de posições com mais de 0 de variabilidade Shannon dividido pelo número de posições com 0 de variabilidade Shannon. Para tal, foram consideradas todas as estirpes descritas neste estudo. Foram avaliadas as 29 posições presentes na região variável das sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale*.

V RESULTADOS

5.1. Frequência e riquetsemia do *A. marginale*

As bezerras criadas na Pesagro-Rio, estado do Rio de Janeiro e na fazenda Germânia, estado de São Paulo, foram avaliadas para infecção por *A. marginale*, durante o primeiro ano de vida, por volume globular (hematócrito), teste direto (esfregaço sanguíneo), sorológico (ELISA e RIFI) e molecular (qPCR) (Tabela 1).

O hematócrito médio dos animais variou de 27 a 37 na Pesagro-Rio e 28 a 36 na fazenda Germânia. Nos animais da Pesagro-Rio, a transmissão transplacentária do *A. marginale* foi sugerida em 15% (3/20) dos animais através da qPCR/Semi-Nested-PCR. A frequência do *A. marginale* nos animais variou de 10% (animais recém-nascidos) a 80% (animais aos 90 dias de idade) por esfregaço sanguíneo, 35% (animais recém-nascidos) a 70% (animais de 360 dias de idade) pelos testes sorológicos ELISA/RIFI e de 15% (entre recém-nascidos) a 100% (animais aos 90 dias de idade) pela qPCR/Semi-Nested-PCR. Foram observadas as seguintes concordâncias entre os testes: qPCR/ELISA 57% (50/88), qPCR/RIFI 55% (48/87), qPCR/esfregaço sanguíneo 65% (54/83), ELISA/esfregaço sanguíneo 70% (45/64), ELISA/RIFI 95% (52/55), RIFI/esfregaço sanguíneo 71% (44/62) e qPCR/ELISA/RIFI/esfregaço sanguíneo 41% (36/88). A quantificação do número de cópias da MSP1a do *A. marginale* por μL de sangue identificou animais com riquetsemia sugestiva de infecção aguda a crônica. Os níveis riquetsêmicos nos animais positivos variaram de $1,04 \times 10^1$ a $4,36 \times 10^{12}$ cópias da *mSP1a* por μL de sangue.

Nos animais da Fazenda Germânia, a transmissão transplacentária do *A. marginale* foi sugerida em 15% (3/20) dos animais por qPCR. A frequência do *A. marginale* variou de 20% (recém-nascidos) a 90% (90-180 dias de idade) pelo esfregaço sanguíneo, 20% (recém-nascidos) a 80% (um ano de idade) pelo ELISA/RIFI e de 15% (entre os recém-nascidos) a 100% (a partir dos 90 dias de idade) pela qPCR/nPCR. Entre os testes utilizados, foram observadas as seguintes concordâncias: qPCR/RIFI 58% (49/84), qPCR/ELISA 61% (51/84), RIFI/esfregaço sanguíneo 69% (50/72), ELISA/esfregaço sanguíneo 72% (50/72), qPCR/esfregaço sanguíneo 87% (72/83), ELISA/RIFI 96% (50/52) e qPCR/ELISA/RIFI/esfregaço

sanguíneo 58% (49/84). A quantificação absoluta pela qPCR variou de $1,20 \times 10^1$ a $5,17 \times 10^6$ cópias da MSP1a por μL de sangue, permanecendo todos os animais com níveis riquetsemicos condizente com infecção crônica.

Uma qPCR para o gene *mSP1b* do *A. marginale* foi realizada como triagem para seleção das amostras positivas que posteriormente foram submetidas a uma PCR convencional e a uma Semi-Nested-PCR. Na qPCR, as amostras foram testadas em triplicata, totalizando oito placas (E=100, 101, 102, 101, 103, 101, 100 e 101; $R^2=0,995, 0,995, 0,985, 0,985, 0,990, 0,995, 0,986, 0,985$; Slope=3,317, 3,298, 3,278, 3,227, 3,332, 3,286, 3,308, 3,279; $y=38,391, 58,514, 38,641, 48,475, 53,483, 47,803, 56,186, 46,839$). Um total de 187 amostras foram avaliadas, sendo que 83.0% (83/100) pertencentes a Pesagro-Rio e 80.4% (70/87) pertencentes a Fazenda Germânia mostraram-se positivas na qPCR para *A. marginale* (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de animais positivos (%) para *A. marginale* detectados por exame direto (esfregaço sanguíneo), teste sorológico (ELISA/RIFI) e análise molecular (qPCR) e valores médios do volume globular (hematócrito) em bezerras naturalmente infectadas na Pesagro-Rio, estado do Rio de Janeiro, e Fazenda Germânia, estado de São Paulo, Brasil.

Idade dias	Frequência													
	Esfregaço sanguíneo		Riquetsemia no Esfregaço		Hematócrito		ELISA		RIFI		qPCR		Média da Riquetsemia qPCR*	
	RJ	SP	RJ	SP	RJ	SP	RJ	SP	RJ	SP	RJ	SP	RJ	SP
1	10	20	0,4	0,2	27	28	40	20	35	20	15	15	1,04x10 ¹	1,21x10 ¹
90	80	90	8,2	6,4	31	29	50	40	50	40	100	100	4,36x10 ¹²	3,06x10 ⁵
180	70	90	5,2	1,2	37	36	60	50	55	50	100	100	7,91x10 ⁴	2,15x10 ⁴
270	60	80	3,8	0,8	34	36	55	70	55	60	100	100	1,54x10 ⁵	2,24x10 ³
360	50	80	1,2	0,8	35	35	70	80	65	80	100	100	5,23x10 ⁵	3,37x10 ³

RJ - Rio de Janeiro; SP - São Paulo; *Número de cópias da *msp1b* por μ L de sangue.

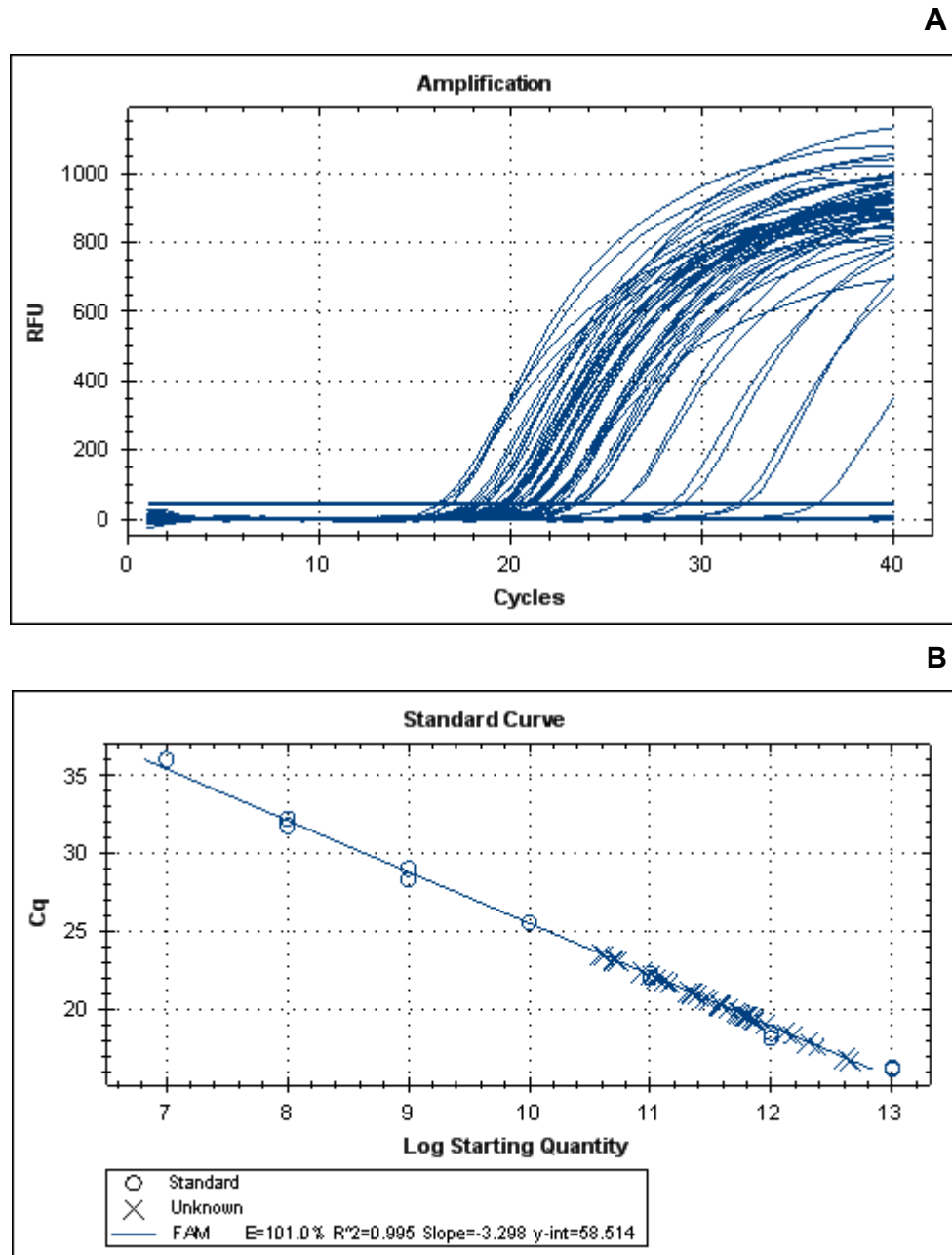


Figura 2. Curva de amplificação (A) e curva padrão (B) da qPCR com oligonucleotídeos iniciadores para o gene *mps1b*. A curva padrão do número de ciclos (Ct) versus as diluições seriadas dos padrões com diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo a sequência-alvo ($2,0 \times 10^7$ cópias/ μL a $2,0 \times 10^0$ cópias/ μL). A figura apresenta os ciclos de amplificação da diluição seriada usando um controle padrão para quantificar as amostras infectadas por *A. marginale*.

5.2. Análises das sequências MSP1a do *A. marginale*

Das 153 amostras positivas na qPCR para o gene *msp1b*, 61,4% (51/83) pertencentes à Pesagro-Rio e 12,8% (9/70) pertencentes à Fazenda Germânia mostraram-se positivos na Semi-Nested-PCR para *A. marginale* (Figura 3).

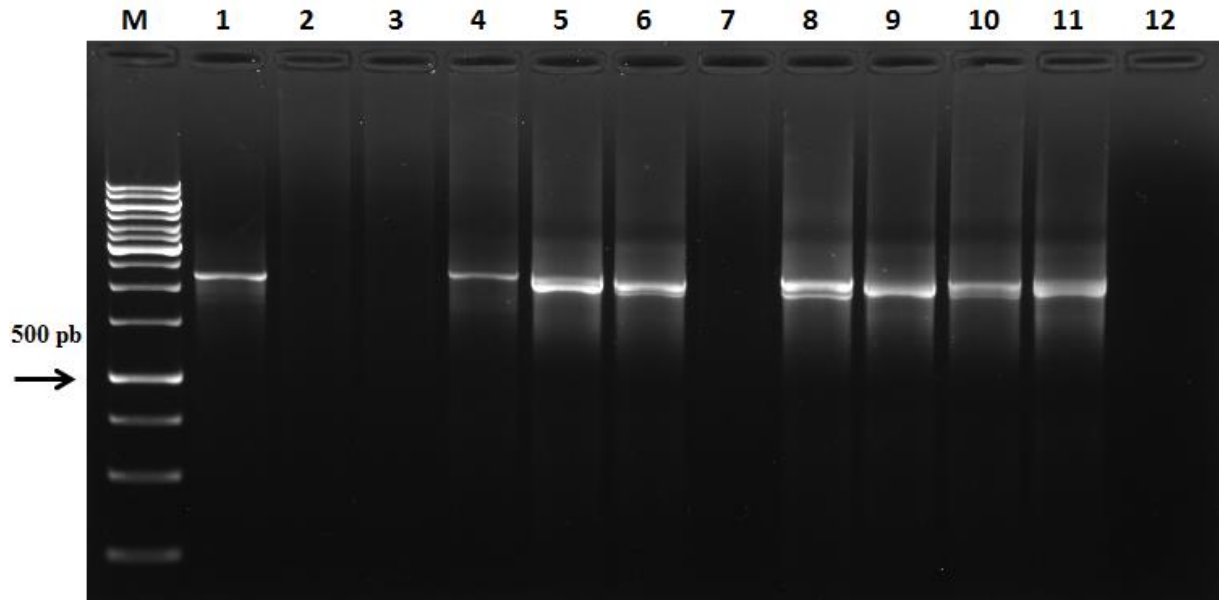


Figura 3. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com Brometo de Etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos à Semi-Nested-PCR para *A. marginale* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores 1733F/3134R e 2957R. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos); Canaleta 1: controle positivo; Canaletas 2, 3 e 7: amostra de bovinos negativos; Canaleta 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11: amostra de bovinos positivos; Canaleta 12: branco (água esterilizada ultra pura).

O gene *msp1a* foi amplificado e produtos de 51 amostras pertencentes aos animais da Pesagro-Rio (Tabela 2) e nove amostras pertencentes aos animais da Fazenda Germânia foram sequenciadas (Tabela 4). A análise do microssatélite da MSP1a do *A. marginale* indicou a presença dos genótipos E (50/51) e G (1/51) nos animais da Pesagro-Rio. Tanto o genótipo E quanto G possuem uma distância de 23 nucleotídeos entre a região de Shine-Dalgarno (GTAGG) e códon inicial (ATG).

Tabela 2. Organização das sequências repetidas da MSP1a das estirpes do *A. marginale* (número de acesso no GenBank KJ398348-KJ398398) de bezerras da Pesagro-Rio, estados do Rio de Janeiro. A identificação das 19 diferentes estirpes do *A. marginale* foi baseada no Local/microsatélite/genótipo – (estrutura das sequências repetidas da MSP1a).

Estrutura da sequências repetidas da <i>msp1a</i>	Número de amostra	Riquetsemia absoluta qPCR (<i>msp1a</i> /mL)
RJ/E - (4-63-27)	14	$1,50 \times 10^4 - 2,22 \times 10^{12}$
RJ/E - (78-24 ² -25-31)	12	$4,13 \times 10^4 - 6,76 \times 10^{12}$
RJ/E - (τ -10 ² -15)	9	$1,02 \times 10^4 - 8,13 \times 10^{11}$
RJ/E - (4-63-4)	1	$2,07 \times 10^4$
RJ/E - (4-63-3)	1	$7,68 \times 10^{11}$
RJ/E - (4-63-177)	1	$9,29 \times 10^4$
RJ/E - (175-63-27)	1	$5,12 \times 10^4$
RJ/E - (τ -10 ² -176)	1	$1,32 \times 10^5$
RJ/E - (165-10 ² -166)	1	$4,19 \times 10^4$
RJ/E - (78-24 ² -171-31)	1	$8,68 \times 10^{10}$
RJ/E - (78-24-172-24-173)	1	$5,21 \times 10^{11}$
RJ/E - (α -174- β)	1	$2,00 \times 10^5$
RJ/E - (176-174- β^2 - τ)	1	$1,74 \times 10^5$
RJ/E - (174-176- β^2 - τ)	1	$1,76 \times 10^4$
RJ/E - (174-176- β^2 -186)	1	$3,94 \times 10^5$
RJ/E - (167-168- β^2 -169-170)	1	$4,06 \times 10^{10}$
RJ/E - (178-179-180-181-182)	1	$3,27 \times 10^4$
RJ/G - (163-164 ³ -61)	1	$4,64 \times 10^4$
RJ/E - (182-24-183-184-185)	1	$5,46 \times 10^6$

A identificação dos genótipos/estirpes foi feita baseada na estrutura do microsatélite da *msp1a* (ESTRADA PEÑA et al., 2009). O número subscrito representa a quantidade de vezes que a sequência repetida aparece. A riquetsemia dos animais foi calculada baseando-se no número de cópias de DNA por mL de sangue (ERIKS et al., 1993). As novas sequências repetidas da MSP1a foram nomeadas de 165-186 segundo o sistema proposto por de la Fuente et al. (2007).

As estirpes do *A. marginale* 4-63-27, 78-24²-25-31 e τ -10²-15 foram identificadas nos animais que nasceram infectados, sugerindo, assim, a capacidade destas estirpes realizarem a transmissão transplacentária. A maior [$6,76 \times 10^{12}$] e a menor [$1,50 \times 10^4$] riquetsemia foram observadas em animais infectados com a estirpe 4-63-27 e 78-24²-25-31, respectivamente. Vinte e duas sequências novas foram descritas e nomeadas entre 165-186 nos animais da Pesagro-Rio (Tabela 3).

Tabela 3. Novas sequências de repetições da MSP1a do *A. marginale* identificadas nos animais da Pesagro-Rio, estado do Rio de Janeiro e Fazenda Germânia, estado de São Paulo. O código de uma letra é usado para nomear os diferentes aminoácidos das sequências repetidas da MSP1a. Posições de aminoácidos com deleções/inserção (-) são mostradas. As novas sequências repetidas da MSP1a foram nomeadas de 165-186 na Pesagro-Rio e 190 na Fazenda Germânia, seguindo proposto por de la Fuente et al. (2007) e atualizado por Cabezas-Cruz et al. (2013).

Novas sequências	Sequências repetidas da MSP1a	Nº de aminoácidos
A	DDSSSASGQQQESSVSSQSE-ASTSS-QLG--	28
165	TDSSSASGQQQESSVLSPSGHVRTSS-QLG--	29
166	ADSSSGRGQQQESGVLSQSGQASTSS-QLG--	29
167	ADSSSASG-----VLSQSGEATTSA-QLR--	23
168	TDSSSAGDQPQGSVSSQSGQASTSA-QLR--	29
169	TDSSSATDQQQESGVSSQSGQASTSA----VG	28
170	TDSSSASAQQQESSVSSHTD-RSTSS-Q--VG	29
171	ADSSSASGQQQESSVLSQSSQASTSS-QLR--	29
172	ADSSSAGNQQQESSVLSQSGQASTSS-QSG--	28
173	ADSSSAGNQQQESSVSSQSD-ASTSS-DYG--	28
174	TDSSSAGDQQQGSVSSQSGQASTSS-QLR--	29
175	TDSSSASGQQQESSVLSQSGHASTSS-QLG--	29
176	ADSSSASGQQQESGVLSQSAQASTSS-QLG--	29
177	ADSSSASGQQQESSVLSQSDHASTSS-QLG--	29
178	DDSSSADDQQQESSVSSQSG-DSTSS-QLG--	28
179	TDSSSAGDQQQESSVSSQSG-DSTSS-QLG--	28
180	TDSSSAQHQQQESNVSSQTG-NSTSS-QLG--	28
181	NDTSSAGHQQQESNVSSQSG-DSTSS-QLG--	28
182	TDSSTAGDQQQESSVSSQSG-ASTSS-QLG--	28
183	VDSSSAGDQQQESSVSSQSG-DSTSS-QLG--	28
184	TDSSSAGDQQQESSVSSQSG-DSTSS-QLG--	28
185	TDNSSASGQQQENSVLSQSSQASTSS-QLG--	29
186	DDSSSAGNQQQESSVLPQSGQASTSS-QLG--	29
190	TDSSSAGDQHQGSVSSQSGQASTSS-QLG--	29

A nova sequência 167 apresentou deleção dos aminoácidos QQQESS localizados entre a posição 9 e 14. Foi observada a presença dos aminoácidos alanina, serina, aspartato e glicina na posição 20, sendo a glicina a mais frequentemente encontrada. Na posição 21 mostrou-se predominante os aminoácidos glutamina, mas também foi observada a histidina e glutamato. Na

posição 31 e 32 duas novas sequências (169 e 170) descritas apresentam os aminoácidos glicina e valina. A análise sobre as sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale* também produziu 30 sequências descritas pela primeira vez no Brasil. Durante o estudo, 10% (2/20) dos animais (Rio16 e Rio19) foram positivos em apenas uma única estirpe do *A. marginale*, 15% (3/20) dos animais (Rio1, Rio11 e Rio14) permaneceram infectados com apenas uma estirpe do *A. marginale*. No entanto, 75% (15/20) dos animais positivos mostraram mais de uma estirpe do *A. marginale*. Um animal (Rio9) mostrou quatro diferentes estirpes do *A. marginale* ao longo do primeiro ano de vida. No rebanho da Fazenda Germânia, estado de São Paulo, após uma triagem das amostras pela qPCR, o gene *msp1a* do *A. marginale* foi amplificado usando uma Semi-Nested-PCR (Tabela 4).

Tabela 4. Organização das sequências repetidas da MSP1a das estirpes do *A. marginale* de bezerras da Fazenda Germânia, estados de São Paulo. A identificação das estirpes do *A. marginale* foi baseada no Local/microsatélite/genótipo – (estrutura das sequências repetidas da MSP1a).

Estrutura da sequências repetidas da <i>msp1a</i>	Número de amostras	Riquetsemia absoluta qPCR (<i>msp1a</i> /mL)
SP/E - (α - β^3 - Γ)	1	$1,32 \times 10^1$ - $3,38 \times 10^4$
SP/E - (α - β^3 - Γ)	1	$2,61 \times 10^2$ - $7,14 \times 10^4$
SP/E - (α - β^3 - Γ)	1	$4,28 \times 10^1$ - $5,17 \times 10^6$
SP/E - (α - β^3 - Γ)	1	$2,14 \times 10^2$ - $2,26 \times 10^4$
SP/E - (α - β^3 - Γ)	1	$2,34 \times 10^2$ - $3,02 \times 10^4$
SP/E - (α - β^3 - Γ)	1	$1,68 \times 10^1$ - $4,93 \times 10^5$
SP/E - (α - β^3 - Γ)	1	$2,49 \times 10^4$ - $1,27 \times 10^3$
SP/E - (α - β^2)	1	$1,65 \times 10^2$ - $3,49 \times 10^3$
SP/E - (α - β^2 -190- Γ)	1	$4,15 \times 10^1$ - $1,52 \times 10^5$

A identificação dos genótipos/estirpes foi feita baseada na estrutura do microsatélite da *msp1a* (ESTRADA PEÑA et al., 2009). O número subscrito representa a quantidade de vezes que a sequência repetida aparece. A infecção dos animais foi calculada baseando-se em no número de cópias de DNA por mL de sangue (ERIKS et al., 1993). As novas sequências repetidas da MSP1a foram nomeadas de 165-186 segundo o sistema proposto por de la Fuente et al. (2007).

Embora 80,4% (70/87) das amostras tenham sido positivas na qPCR, destas, apenas 12,85% (9/70) foram positivas na Semi-Nested-PCR e, posteriormente, sequenciadas. A análise do microssatélite mostrou a circulação apenas do genótipo E. O genótipo E possui uma distância de 23 nucleotídeos entre a região de Shine-Dalgarno (GTAGG) e códon inicial (ATG). Três distintas estirpes foram observadas: $\alpha\text{-}\beta^3\text{-}\Gamma$ (n=7), $\alpha\text{-}\beta^2$ (n=1) e $\alpha\text{-}\beta^2\text{-}190\text{-}\Gamma$ (n=1). As estirpes do *A. marginale* obtidas em bezerras neste estudo apresentaram entre três e cinco sequências repetidas da MSP1a. A sequência repetida 190 foi relatada pela primeira vez no mundo.

No estado do Rio de Janeiro nenhum animal foi medicado contra *A. marginale* ao longo do estudo. Embora os animais tenham apresentado elevada riquetsemia, nenhum animal mostrou sinais clínicos de anaplasose bovina. Porém, no estado de São Paulo foi observado que 80% (16/20) dos animais receberam pelo menos uma vez TERRAMICINA® (Oxitetraciclina, 200 mg/kg, Ouro Fino, Brasil) e IMIZOL® (Dipropionato de imidocarb, 2,1 mg/kg, Bayer, Brasil) para o controle da anaplasose clínica nos primeiros quatro meses de vida. Adicionalmente, observou-se que 35% (7/20) e 15% (3/20) dos animais receberam um segundo e terceiro tratamento, respectivamente. Porém, mesmo assim, 20% (4/20) dos animais vieram a óbito. Não foi possível determinar a relação da riquetsemia dos animais antes e após o tratamento já que as análises foram realizadas trimestralmente. Os quatro animais que vieram a óbito estavam infectados com a estirpe $\alpha\text{-}\beta^3\text{-}\Gamma$.

5.3. Análises das mais frequentes sequências MSP1a do *A. marginale*

O número de sequências da MSP1a do *A. marginale* variou de três a seis repetições. Porém, as estirpes do *A. marginale* mais comumente observadas foram aquelas com três (41%) e cinco (37%) repetições. As estirpes do *A. marginale* mais prevalentes foram 4-63-27 (23,3%), 78-24²-25-31 (20,0%) e $\tau\text{-}10^2\text{-}15$ (15,0%) no Rio de Janeiro e $\alpha\text{-}\beta^2\text{-}\tau$ (11,7%) em São Paulo (Tabela 5). As sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale* mais comumente observadas foram β (n=34), 24 (n=29), 10 (n=22), 4 (n=18), 63 (n=18) e 27 (n=15). No rebanho bovino da fazenda Germânia, apenas quatro (α , β , τ e 190) sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale* foram observados. Porém, no rebanho bovino da Pesagro-Rio, observou-se 35 (α , β , τ , 3, 4, 10, 15, 24, 25, 27, 61, 63, 78, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174,

175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185 e 186) sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale*.

Tabela 5. Ocorrência das estirpes do *A. marginale* mais frequentes observadas em 60 diferentes amostras originadas de 40 bezerras. Todos os 40 animais foram avaliados pelo menos uma vez e no máximo quatro vezes. Os animais pertenciam à Fazenda Germânia, estado de São Paulo, e Pesagro-Rio, estado do Rio de Janeiro.

Amostra	Estado	Estrutura da MSP1a	Nº amostra	Frequência
1ª frequente	Rio de Janeiro	<u>4-63-27</u>	14	23,3 %
2ª frequente	Rio de Janeiro	78- <u>24</u> ² -25-31	12	20,0 %
3ª frequente	Rio de Janeiro	τ - <u>10</u> ² -15	9	15,0 %
4ª frequente	São Paulo	α - <u>β</u> ³ - τ	7	11,7%

As mais frequentes sequências repetidas da MSP1a das estirpes do *A. marginale* foram β (n=34), 24 (n=29), 10 (n=22), 4 (n=18), 63 (n=18) e 27 (n=15).

Em função do número de amostras sequenciadas, apenas na Pesagro-Rio foi possível fazer uma relação entre as estirpes do *A. marginale* identificadas e a idade dos animais. Porém, não foi observada relação entre a idade e o número de sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale* (Tabela 6). A variação nas sequências dos aminoácidos foi maior nas estirpes que apresentavam entre 4 e 6 sequências repetidas da MSP1a. Além disso, verificou-se que as estirpes do *A. marginale* tornam-se apresentam maior número de sequências repetidas quando estas estirpes infectam animais entre nove e doze meses de idade. Foi observada apenas uma estirpe (167-168- β ²-169-170) com seis sequências repetidas da MSP1a. Uma estirpe com cinco sequências repetidas da MSP1a (178-179-180-181-182), apresentou todas sequências descritas pela primeira vez. A estirpe 4-63-27 foi mais prevalente entre os bezerros com idade inferior a seis meses de idade. Porém, nos animais com idade entre seis e 12 meses observou-se alta variação genética das sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale*, sendo descritas 11 (176-186) novas sequências apenas neste período.

Tabela 6. A análise da sequência do microssatélite (Shine Dalgarno [GTAGG] – Códon de inicial [ATG]) da MSP1a em diferentes estirpes do *A. marginale* detectadas em animais de diferentes idades. Todas as sequências repetidas da MSP1a variaram de 1 para 6 em função da idade. O intervalo entre observações foi de três meses.

SR	Nascimento	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
3	4-63-27	4-63-27 4-63-164	4-63-27	α -174- β	175-63-27
4	τ -10 ² -15	*	τ -10 ² -15	τ -10 ² -15 τ -10 ² -176	165-10 ² -176 178-179-180-181-182
5	78-24 ² -25-31	78-24 ² -25-31 78-24 ² -174-31	78-24 ² -171-31	176-174- β^2 - Γ	182-24-183-184-185 174-176- β^2 -186
6	*	*	*	167-168- β^2 -169-170	*

*Nenhuma estirpe observada; ^{SR}Sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale*

Nos animais da Pesagro-Rio, observou-se recombinação entre as estirpes do *A. marginale* circulantes. A conservação dos aminoácidos e as posições envolvidas estão representadas abaixo (Tabela 7). À estirpe 4-63-27 deu origem a quatro outras estirpes 4-63-3, 4-63-4, 175-63-27 e 4-63-177. Neste mesmo rebanho observamos que a estirpe 78-24²-25-31 se recombinau para formar a estirpe 78-24²-171-31 e a estirpe τ -10²-15 originou a variante τ -10²-176. Neste caso, todas as estirpes variantes diferiram em apenas um ou dois aminoácidos da estirpe primária. Na fazenda Germânia apenas uma nova sequência foi descrita. Assim, observou-se que a estirpe mais frequente α - β^3 - Γ se recombinau para formar a estirpe α - β^2 -190- Γ .

Tabela 7. Caracterização das sequências da MSP1a do *A. marginale*. As dez diferentes estirpes do *A. marginale* obtidas de bovinos são apresentadas neste estudo. Diferenças de aminoácidos entre sequências repetidas da MSP1a e posição em evolução por seleção negativa. O código de uma letra é utilizado para os diferentes aminoácidos das sequências repetidas da MSP1a. Posições de aminoácidos conservados estão destacadas com asteriscos.

Local	Estirpe	Sequência repetida da MSP1a
Rio de Janeiro	4-63-27 e 4-63-3	*
	3 27	ADSSSASGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG ADSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG
Rio de Janeiro	4-63-27 e 4-63-4	* *
	4 27	TDSSSASGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG ADSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG
Rio de Janeiro	4-63-27 e 175-63-4	*
	175 4	TDSSSASGQQQESSVLSQSGHASTSSQLG TDSSSASGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG
Rio de Janeiro	4-63-27 e 175-63-63	* *
	63 27	AGSSSASGQQQESSVLSQSGQASTSSQLG ADSSSASGQQQESSVLSQSDQASTSSQLG
Rio de Janeiro	78-24 ² -25-31 e 78-24 ² -171-31	*
	171 25	ADSSSASGQQQESSVLSQSSQASTSSQLR ADSSSASGQQQESSVLSQSSQASTSSQLG
Rio de Janeiro	τ -10 ² -15 e τ -10 ² -176	*
	176 15	ADSSSASGQQQESGVLSQSAQASTSSQLG ADSSSASGQQQESGVLSQSGQASTSSQLG
São Paulo	α - β^3 - Γ e α - β^2 -190- Γ	*
	β 190	TDSSSAGDQQQGSGVSSQSGQASTSSQLG TDSSSAGDQHQGSGVSSQSGQASTSSQLG

A análise das sequências repetidas da MSP1a nas posições 4 (Serina), 15 (Valina) e 25 (Serina) mostrou apenas um aminoácido. Porém, nas posições 1, 7, 8, 14, 16, 20, 21 e 28 observou-se alta variabilidade, estando presentes nestas posições de cinco a seis aminoácidos diferentes (Figura 4). Neste estudo, das 60 amostras do *A. marginale* descritas (Rio de Janeiro e São Paulo), foi possível observar 50 diferentes sequências repetidas da MSP1a. A variabilidade média foi de 0,61 e a proporção de aminoácidos variáveis e conservados foi de 8,66.

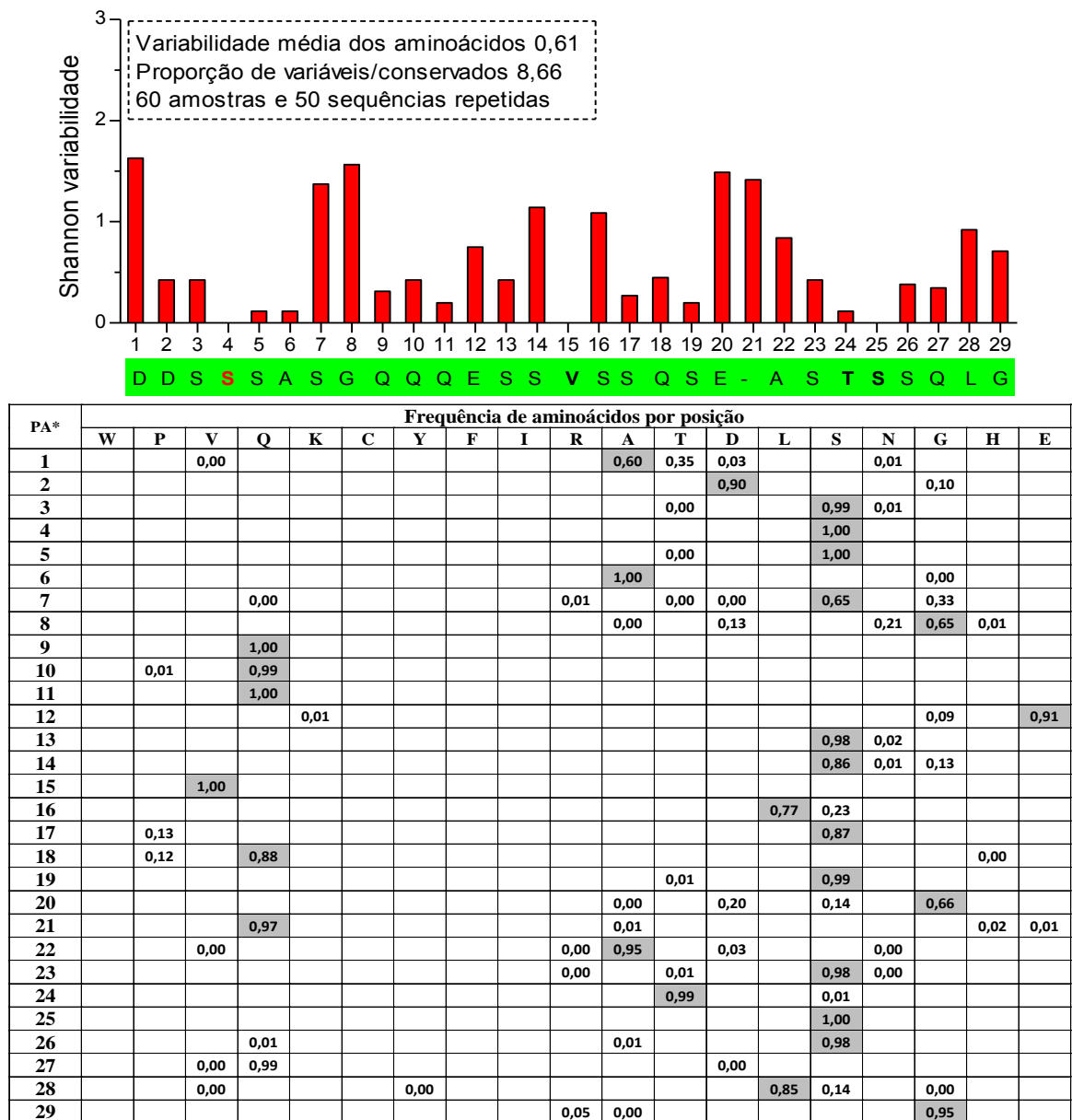


Figura 4. Frequência de aminoácidos por posição nas sequências repetidas da MSP1a. A frequências de aminoácidos por posição nas sequências repetidas da MSP1a foi calculada pela fórmula de Variabilidade = número de aminoácidos diferentes em cada posição/frequência do mais comum aminoácido nesta posição. A primeira letra do nome do aminoácido foi usada como código e o mais comum aminoácido por posição aparece colorido de cinza. PA*=Posição do Aminoácido.

5.3 Análise filogenética do gene *msp1a* do *A. marginale*

Á análise filogenética das 19 diferentes estirpes do *A. marginale*, baseada na sequência de aminoácidos de da MSP1a, identificadas nos animais da Pesagro-Rio, estado do Rio de Janeiro, mostrou alta divergência. Todas as análises (NJ e ML) mostraram topologia similar, sendo as estirpes estudadas relacionadas ao grupo τ ou α (Figura 5).

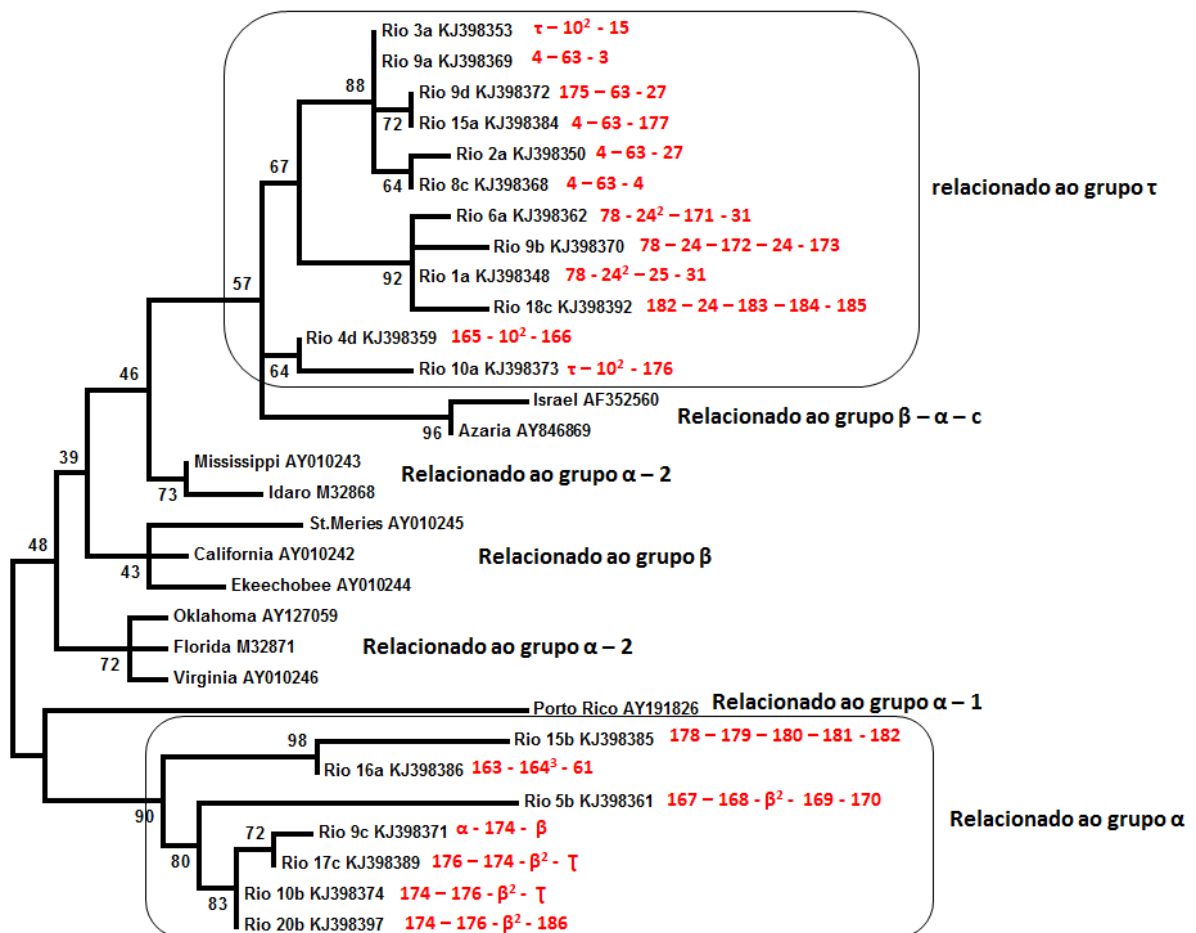


Figura 5. Análise filogenética da sequência de aminoácidos da MSP1a das estirpes do *A. marginale* identificadas em bezerras, Pesagro-Rio, estado do Rio de Janeiro. A figura mostra a árvore consensada de análise filogenética ML e NJ. Os números acima dos ramos internos representam os valores de bootstrap (1000 repetições). Os números de acesso GenBank da MSP1a das respectivas sequências utilizadas na árvore filogenética são mostrados.

Baseando-se nas 51 sequências repetidas da MSP1a avaliadas, 19 diferentes estirpes do *A. marginale* foram observadas e utilizadas para construção da árvore filogenética. Com base na estrutura bidimensional da MSP1a, observou-se dois distintos grupos. No grupo relacionado τ , 12 diferentes estirpes do *A. marginale* foram agrupadas (57% a 92% de suporte no “bootstrap”) e no grupo relacionado α 7 diferentes estirpes do *A. marginale* foram agrupadas (72 a 98% de suporte no “bootstrap”). No decorrer do estudo o mesmo animal foi infectado por distintas estirpes do *A. marginale*, localizando-se em grupos distintos (Ex.: Rio9, Rio10 e Rio15). A divergência média entre as estirpes do *A. marginale* foi de 0.9%. As estirpes do *A. marginale* identificadas neste estudo diferem de outras estirpes já identificadas no mundo. Assim, das 19 diferentes estirpes observadas, 17 foram descritas pela primeira vez no Mundo.

A análise filogenética baseada na sequência de aminoácidos da MSP1a do *A. marginale* identificou baixa divergência entre as estirpes identificadas no rebanho da fazenda Germânia, estado de São Paulo (Figura 6). As análises (NJ e ML) produziram topologias semelhantes e as mesmas relações para todos os principais grupos que foram identificados neste estudo e representados na árvore por análise NJ. Com base nas repetições em série da MSP1a das 9 estirpes analisadas, 3 diferentes sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale* foram identificadas e utilizadas para construir a árvore filogenética (Tiaçu 1 [α - β^3 - Γ], Tiaçu 2 [α - β^2] e Tiaçu 3 [α - β^2 -190- Γ]). Duas diferentes sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale* (Tiaçu1 e Tiaçu3) foram agrupados juntamente com as estirpes identificadas em bovinos do Rio de Janeiro [Brasil], Jaboticabal [Brasil] e Santa Fé [Argentina] com 52-100% de suporte no “bootstrap”. Por outro lado, uma sequência repetida da MSP1a (Tiaçu2) foi agrupada junto das estirpes identificadas em bovinos de Minas Gerais [Brasil] com 52-86% de suporte no “bootstrap”.

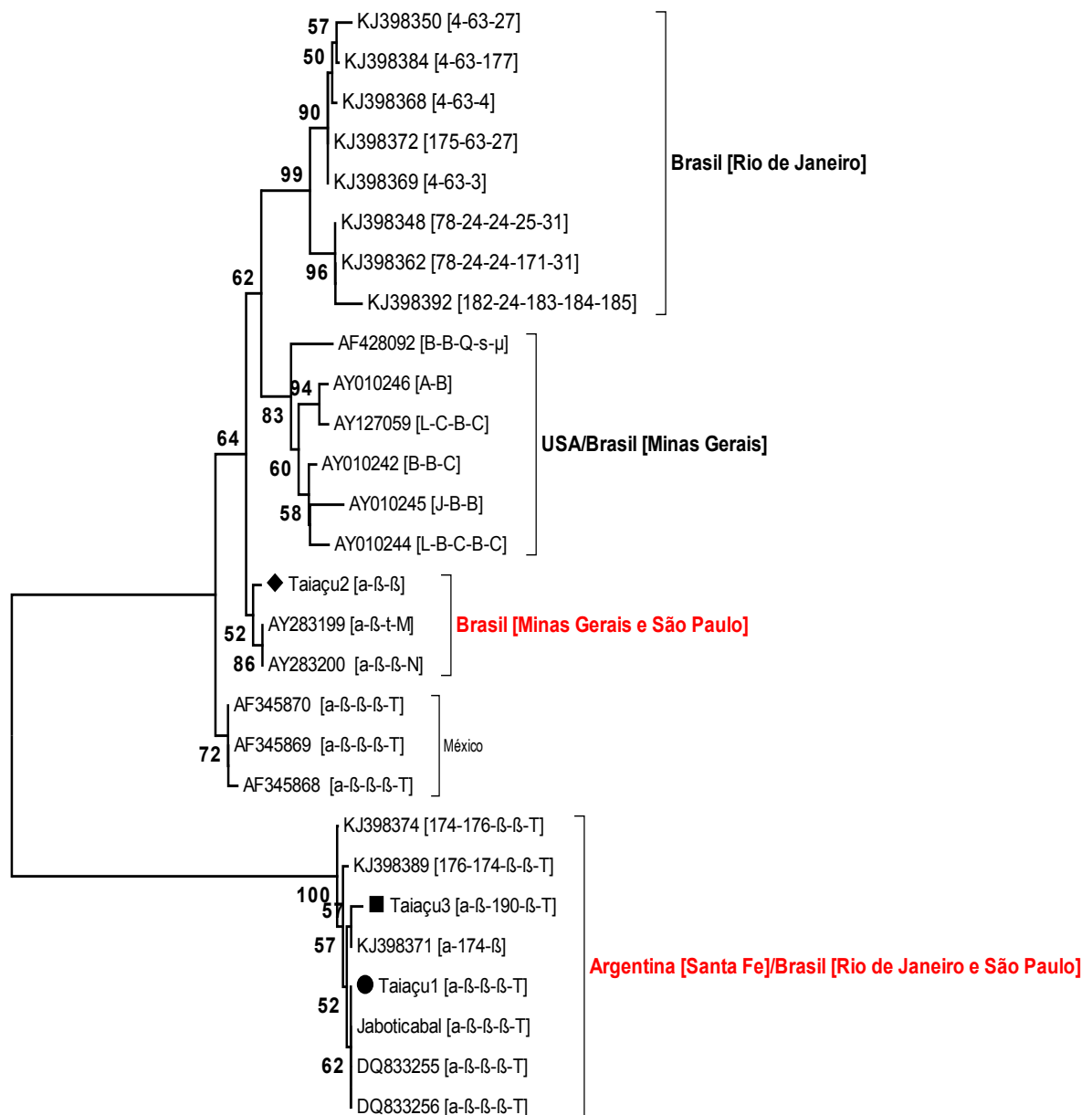


Figura 6. Análise filogenética das estirpes do *A. marginale* identificadas em bezerras, fazenda Germânia, estado de São Paulo. A figura mostra a árvore consenso de análise filogenética ML e NJ. Os números acima dos ramos internos representam os valores de bootstrap (1000 repetições). Os números de acesso GenBank MSP1a das respectivas sequências utilizadas na árvore filogenética são mostrados.

VI DISCUSSÃO

Anaplasmosse bovina é endêmica em todo o Brasil, onde surtos da doença clínica causam perdas econômicas para a indústria bovina (VIDOTTO et al., 1998; KOCAN et al., 2010). Embora estudos sorológicos (MADRUGA et al., 1985; MELO et al., 2001; SOUZA et al., 2001; ARAÚJO et al., 2003; ANDRADE et al., 2004) indiquem a ocorrência de estabilidade enzoótica na maior parte do país, surtos de anaplasmosse clínica ainda ocorrem com frequência no Brasil. Assim, a definição de estabilidade endêmica baseada na soroprevalência como indicador de exposição ao carrapato e agentes transmitidos por estes, exige além do conhecimento sobre a soroprevalência e frequência da doença nos animais, a taxa de infestação por carrapatos e identificação das estirpes/genótipos do *A. marginale* (JONSSON et al., 2012). No rebanho da fazenda Germânia, 80% dos animais necessitaram de tratamento com drogas antimicrobianas. Adicionalmente, quatro animais vieram a óbito, mesmo mostrando sorologia positiva e sendo tratados com Oxitetraciclina e Imidocarb. No rebanho da Pesagro-Rio todos os animais mostraram-se positivos para *A. marginale* na Semi-Nested-PCR, porém, a ocorrência de anticorpos anti-*A. marginale* foi inferior a 75%. Vale ressaltar que, nenhum animal foi tratado com antimicrobianos e, mesmo assim, não foram observados casos clínicos de anaplasmosse. Assim, a estabilidade enzoótica existe apenas no rebanho bovino da Pesagro-Rio, tendo como base a ocorrência de anaplasmosse clínica e os resultados da qPCR e ELISA/RIFI. Portanto, a associação entre a prevalência do *A. marginale* e ocorrência de doença clínica e/ou mortalidade é mais complexa do que previamente estabelecido para o sistema *R. (B.) microplus-B. bovis* na Austrália por Mahoney e Ross, 1972.

Embora já tenha sido sugerido a ocorrência de transmissão transplacentária do *A. marginale* no Brasil (GRAU et al., 2013; POHL et al., 2013), este foi o primeiro estudo a descrever as estirpes do *A. marginale* (4-63-27, 78-24²-25-31 e T-10²-15 possivelmente com a capacidade de infectar os fetos. Na Pesagro-Rio, 19 diferentes estirpes do *A. marginale* circularam nas bezerras testadas, porém, apenas três foram transmitidas pela placenta. No rebanho da fazenda Germânia, embora três animais tenham apresentado resultado positivo na qPCR, sugerindo a ocorrência de

transmissão transplacentária, estas estirpes apresentaram resultado negativo na Semi-Nested-PCR, não sendo assim possível sequenciá-las. A diferença nos resultados observados na Semi-Nested-PCR e qPCR pode ter ocorrido por consequência na diferença no nível riquetsêmico das amostras e diferença na sensibilidade dos ensaios de PCR (DE LA FUENTE et al., 2002). O gene *msp1a* do *A. marginale* tem sido amplificado em amostras com 1% ou mais de eritrócitos infectados (DE LA FUENTE et al., 2003).

A transmissão transplacentária pode ocorrer quando as vacas têm anaplasnose aguda durante a gestação (ZAUGG e KUTTLER, 1984) ou pode ser devido a infecções constantes em áreas endêmicas (POTGIETER e VANRENSBURG, 1987). A estirpe do *A. marginale* τ -10²-15 foi previamente relatada circulando no Brasil (VIDOTTO et al., 2006) e Argentina (RUYBAL et al., 2009). Por isso, a confirmação de que esta estirpe, detectado em 27,5% dos animais estudados, teria possivelmente a capacidade de ser transmitida pela placenta, sugere que este tipo de transmissão pode ter grande importância na prevalência do *A. marginale* nestas regiões.

Neste estudo, as estirpes do *A. marginale* que possivelmente realizaram transmissão transplacentária apresentavam variação de 28 a 29 nucleotídeos na região SD-ATG. A distância da região SD-ATG pode afetar a expressão da MSP1a, influenciando na infecção e transmissão do *A. marginale*. Um nível maior de expressão da MSP1a foi relatado para distâncias SD-ATG de 23 a 29 nucleotídeos e menor expressão para uma distância de 19 nucleotídeos (ESTRADA-PEÑA et al., 2009). Estirpes do *A. marginale* com distância SD-ATG de 23 nucleotídeos mostraram capacidade de realizarem transmissão congênita em bovinos no estado de Minas Gerais, Brasil (POHL et al., 2013). No presente estudo, todas as estirpes identificadas na Pesagro-Rio e na Fazenda Germânia apresentavam distância SD-ATG de 23 nucleotídeos, porém, apenas três foram transmitidas via placenta. Assim, existem fortes indícios que a distância SD-ATG é realmente relevante para determinar a via de transmissão do *A. marginale*, mas estudos ainda são necessários para confirmar se os demais genótipos também possuem essa capacidade.

A frequência do genótipo E observada neste estudo pode indicar que esse é mais adaptado às condições estudadas, portanto, pode ser mais eficiente para infectar os bovinos. O genótipo E tem distância SD-ATG de 23 nucleotídeos. Este genótipo têm sido correlacionado com altos níveis de expressão da proteína MSP1a (ESTRADA-PEÑA et al., 2009), sugerindo que essas estirpes apresentam alto potencial infectivo. Avaliando a distribuição de nove genótipos diferentes em quatro ecossistemas distintos ao redor do mundo, observou-se que, na América do Sul, especialmente no Brasil e na Argentina, predomina o genótipo E (ESTRADA-PEÑA et al., 2009). No entanto, os genótipos B, C, D e G também já foram previamente detectados na Argentina e no Brasil (DE LA FUENTE et al., 2004; VIDOTTO et al., 2006; RUYBAL et al., 2009; POHL et al., 2013). O genótipo G é o mais frequente nas ecorregiões da África do Sul, México e partes dos EUA (ESTRADA-PEÑA et al., 2009). Interessantemente, o genótipo G foi observado em apenas um animal do rebanho bovino da Pesagro-Rio.

Quando comparamos as sequências de repetição encontrados neste estudo com as sequências já analisadas (CABEZAS-CRUZ et al., 2013) e disponíveis no GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>], o presente estudo foi capaz de descrever 22 novas sequências repetitivas e também relatar a ocorrência de 30 sequências repetidas da MSP1a descritas pela primeira vez no Brasil. Adicionalmente este estudo também descreveu pela primeira vez as estirpes 4-63-27, 78-24²-25-31 e τ -10²-15. As sequências repetidas da MSP1a variam molecularmente em diferentes áreas geográficas entre estirpes do *A. marginale* e são funcionalmente importantes na infecção e transmissão biológica deste patógeno (MCGAREY e ALLRED, 1994; DE LA FUENTE et al., 2007). Além disso, a análise das sequências repetidas da MSP1a fornece informações sobre a evolução do *A. marginale* e é usada para caracterizar a diversidade genética do patógeno (DE LA FUENTE et al., 2001a, 2007; PALMER et al., 2001, 2004).

As estirpes τ -10²-15 e α - β^3 - Γ mostraram alta frequência nas bezerras da Pesagro-Rio e Fazenda Germânia, respectivamente. Uma variante da estirpe τ -10²-15 (τ -10-15) foi mostrada circulando em bovinos do Brasil e Argentina (VIDOTTO et al., 2006; RUYBAL et al., 2009) e a estirpe α - β^3 - Γ em bovinos da Argentina (RUYBAL et al., 2009), México (ALMAZÁN et al., 2008) e Taiwan (CABEZAS-CRUZ

et al., 2013), países onde a anaplasmoze bovina é endêmica. Adicionalmente, foi associada a presença da estirpe $\alpha\beta^3\text{-}\Gamma$ com a ocorrência de anaplasmoze no México (ALMAZÁN et al., 2008). Porém, este é o primeiro estudo que detecta a estirpe $\alpha\beta^3\text{-}\Gamma$ em bezerras de uma propriedade com casos clínicos da doença e tratamento antimicrobiano frequente e, ainda a estirpe $\tau\text{-}10^2\text{-}15$ em bezerras clinicamente sadias no Brasil. No presente estudo, as sequências repetidas da MSP1a mais comumente observadas foram α , β e τ . Estes resultados apoiam estudos anteriores que mostram que, na América do Sul, as sequências repetidas da MSP1a mais frequentes são 4, 8, 16, 56, 60, 64, 67, α , β , γ , π e τ (ESTRADA-PEÑA et al., 2009). Além disso, tanto nas estirpes descritas neste estudo quanto nos trabalhos anteriores realizados na América do Sul, observou-se que, as sequências mais frequentes na primeira repetição foram α , τ , 4, 16, 72 e B (VIDOTTO et al., 2006; RUYBAL et al., 2009; POHL et al., 2013).

A alta prevalência da estirpe 4-63-27 pode estar associada à baixa ocorrência de dípteros hematófagos e/ou à alta infestação por carrapatos. No rebanho da Pesagro-Rio praticamente não haviam dípteros circulando nos animais. Por outro lado, a população de carrapatos *R. (B.) microplus* foi abundante o ano todo. Sequências repetidas da MSP1a, como 27 e 13, foram encontradas em estirpes do *A. marginale* que circulam na América Latina e África do Sul (DE LA FUENTE et al., 2007; POHL et al., 2013; MUTSHEMBELE et al., 2014). Estes resultados são consistentes com a distribuição geográfica do carrapato *R. (B.) microplus* (SCOLES et al., 2005), o mais provável vetor biológico do *A. marginale* em regiões tropicais. No entanto, outras espécies de carrapatos, além da transmissão mecânica, também podem desempenhar papel importante na distribuição do patógeno (KOCAN et al., 2004) e ainda devem ser avaliadas no Brasil.

As estirpes do *A. marginale* naturalmente transmitidas por *R. (B.) microplus* em áreas tropicais são geneticamente distintas das estirpes comumente transmitidas por *D. andersoni* em regiões temperadas (FUTSE et al., 2003; SCOLES et al., 2007). O número de organismos na glândula salivar após a alimentação e a capacidade de transmissão da estirpe Porto Rico é significativamente superior no *R. (B.) microplus* quando comparado ao *D. andersoni*. Em contraste, um número superior da estirpe St. Maries multiplicou-se na glândula salivar e foi transmitida por *D. andersoni* quando

comparado com *R. (B.) microplus*. Como a replicação e desenvolvimento do patógeno dentro da glândula salivar são as principais determinantes da transmissão, a adaptação de uma determinada estirpe do *A. marginale* para um vetor disponível em uma área geográfica, resulta no aumento da replicação, proporcionando ao patógeno uma vantagem competitiva em regiões endêmicas, onde existem numerosas estirpes do *A. marginale* (NICHOLLS et al., 1980). No entanto, isso não é uma limitação da capacidade de um vetor para adquirir e transmitir uma estirpe que tenha origem em outra região endêmica, pelo menos na ausência de outras estirpes concorrentes (FUTSE et al., 2003).

A repetição 4 da MSP1a presente na estirpe 4-63-27 também foi observada em estirpes do *A. marginale* no México (ALMAZÁN et al., 2008), Israel (MOLAD et al., 2009), África do Sul (MUTSHEMBELE et al., 2014) e Filipinas (YBANEZ et al., 2014). Na África do Sul também foi observada alta prevalência e variação de estirpes contendo a sequência 4 da MSP1a (MUTSHEMBELE et al., 2014). Assim, essas estirpes devem ser consideradas relevantes para o desenvolvimento de vacinas baseadas na MSP1a. Além disso, foi sugerido que essas vacinas devem ser combinadas com estratégias de controle dos carrapatos, a fim de minimizar a diversidade genética do *A. marginale* (MUTSHEMBELE et al., 2014).

Neste estudo, observou-se 60 amostras do *A. marginale*, 50 sequências repetidas da MSP1a, sendo a variabilidade média de 0,61 e a estirpe 4-63-27 a mais prevalente. Além do Brasil, já foram descritas e analisadas MSP1a de estirpes do *A. marginale* na Venezuela, Argentina, México, Estados Unidos, Israel, Filipinas e África do Sul (DE LA FUENTE et al., 2007; CABEZAS-CRUZ et al., 2013). Na Venezuela foram descritas 28 estirpes, 72 repetições e a variabilidade de 0,72. Á alta variabilidade e baixo número de amostras analisadas não permitiu identificar a estirpe mais frequente, porém, as repetições 61-62 estavam presentes em diversas estirpes. Na Argentina foram descritas 30 amostras, 31 repetições, variabilidade de 0,40 e a mais prevalente estirpe foi $\alpha\text{-}\beta^3\text{-}\Gamma$. Na América Central, observou-se no México 27 amostras, 27 repetições, variabilidade moderada de 0,57 e circulação mais frequente da estirpe $\alpha\text{-}\beta^3\text{-}\Gamma$. Na América do Norte, observou-se nos EUA 75 amostras, 43 repetições, variabilidade baixa de 0,30 e as estirpes mais frequentes são compostas pela sequência repetida B. Nas Filipinas foram descritas 52

amostras, 37 repetições e a variabilidade foi de 0,57. Em Israel a variabilidade foi de 0,30 e a estirpe mais frequente foi 1-F-M-13. Na África do Sul foram descritas 75 amostras, 52 repetições, variabilidade de 0,42 e a estirpe mais prevalente foi 34-13-4-37. Assim, a estirpe com maior número de sequências repetidas da MSP1a (D⁹-E) foi observada nos Estados Unidos, porém, apenas duas sequências distintas. Por outro lado, na Venezuela e Brasil, as estirpes apresentaram elevada variabilidade entre a primeira e as demais repetições.

Os resultados apresentados no presente estudo corroboram com aqueles encontrados por Cabezas-Cruz et al. (2013), em que apenas foi encontrada na posição 4 serina, na 15 valina e na 25 na serina em sequências repetidas da MSP1a. Nas posições 1, 7, 8, 14, 16, 20, 21 e 28 foram observadas as maiores variações dos aminoácidos. No entanto, observou-se que os aminoácidos valina, arginina, alanina, aspartato e asparagina estavam presentes na posição 22, enquanto que a análise realizada por Cabezas-Cruz et al. (2013) não encontraram variações nesta posição, estando apenas presente nesta posição a alanina. Adicionalmente, observou-se que, a estirpe KJ398362 [167-168-β²-169-170] apresentou deleção da sequência de aminoácidos QQQESS na sequência repetida 167. Estudos anteriores mostraram que estirpes do *A. marginale* que apresentam deleção dos aminoácidos incluídos entre as posições 4 e 14 (SSAGGQQQESS) são incapazes de infectar as células de carrapatos (BLOUIN et al., 2003) e não pode ser transmitidas por *Dermacentor variabilis* (KOCAN et al., 2003). Porém, no Brasil, onde *R. (B.) microplus* é o carrapato mais importante da indústria bovina (GRISI et al., 2002), estudos avaliando a capacidade de transmissão biológica desta estirpe do *A. marginale* ainda devem ser realizados.

As novas repetições observadas neste estudo mostraram similaridade genética com sequências previamente existentes. Esta descoberta sugere que as novas repetições em série podem ter se originado recentemente de sequências já existentes no rebanho, fornecendo evidência para a diversidade genética do *A. marginale*. Na fazenda Germânia, a nova sequência 190 [α-β²-190-Γ] e a sequência já conhecida β [α-β³-Γ] diferiram em um único aminoácido localizado na posição 10, com uma glutamina (Q) na sequência β e uma histidina (H) na sequência 190. O aminoácido Q na sequência repetida β é formado pelo códon CAG e uma simples

mutação de guanina para uracila resultou no códon CAU da sequência 190. Isso sugere que a sequência 190 possa ser resultante da sequência β . Adicionalmente, observou-se que a estirpe 4-63-27 deu origem às estirpes 4-63-3, 4-63-4, 175-63-27 e 4-63-177. A estirpe 78-24²-25-31 se recombinau para formar a estirpe 78-24²-171-31 e a estirpe τ -10²-15 deu origem à τ -10²-176. Assim, diversas estirpes do *A. marginale* foram estabelecidas no rebanho. Esses resultados indicam a não ocorrência de seleção para variantes específicas ou processo de "exclusão genética", visto que ambas as estirpes se estabeleceram e foram transmitidas no rebanho (DE LA FUENTE et al., 1999). Além disso, mesmo que apenas um aminoácido tenha variado da estirpe selvagem para as estirpes mutantes, acreditamos que, ao longo do tempo, esta recombinação possa torna-se mais complexa, determinando assim estirpes amplamente distintas (FUTSE et al., 2005).

Entre isolados geográficos, as sequências repetidas da MSP1a do *A. marginale*, localizadas entre a primeira e última sequência são altamente conservadas (DE LA FUENTE et al., 2001a). No entanto, nossos resultados mostraram variação significativa em sequências de aminoácidos para todas as repetições. Mesmo as estirpes com quatro ou mais repetições exibiram variação nas suas sequências repetidas da MSP1a. Assim, mesmo estirpes com cinco sequências repetidas da MSP1a, como 178-179-180-181-182 e 182-24-183-184-185, mostraram cinco diferentes repetições das MSP1a. Essa heterogeneidade genética do *A. marginale* também foi encontrada em um surto de anaplasmoze bovina no leste do Oregon, EUA (PALMER et al., 2001). Porém, em áreas temperadas, comumente as estirpes apresentam uma baixa variação entre a primeira sequência repetida e as demais, como as estirpes D⁹-E (PALMER et al., 2004) e B⁶ e A-B⁷ (ALLREAD et al., 1990) descritas nos EUA.

Na Pesagro-Rio, observamos que 60% (12/20) dos animais foram infectados pela estirpe 4-63-27 (estirpe mais frequente), 40% (6/20) dos animais foram infectados por estirpe menos frequente e, 85% (17/20) foram infectados por mais de uma estirpe do *A. marginale* ao longo do primeiro ano de vida. Assim, foi possível detectar estirpes amplamente distintas (78-24-172-24-173, α -174- β e 175-63-27) no mesmo animal durante o ano. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Ueti et al. (2012) e Palmer e Brayton (2013), os quais mostraram que

diferentes genótipos coexistem no mesmo ecossistema e podem parasitar o mesmo animal, caracterizando uma superinfecção, o que é comum em condições naturais nos países tropicais. Nossos resultados corroboram com aqueles obtidos por Ybañez et al. (2014), mostrando que mais de uma estirpe da MSP1a do *A. marginale* pode circular no mesmo animal. Assim, a maioria dos animais é parasitada pela mais frequente estirpe do *A. marginale* e os demais animais do rebanho são co-infectados por mais de uma estirpe do *A. marginale*.

Em nosso estudo, a explicação mais provável para a heterogeneidade genética do *A. marginale* é que a alta diversidade seja resultado de processos de transmissão distintos, biológico, mecânico e transplacentária, cada qual introduzindo distintos genótipos do *A. marginale* no rebanho. Porém, as causas dessa ocorrência ainda são desconhecidas, mas reflete uma população com alta diversidade genética em ocorrências endêmicas (DE LA FUENTE et al., 2001a). Essa mesma suposição foi anteriormente feita por Palmer et al. (2001) em áreas endêmicas do Oregon, EUA, onde os animais estavam infectados por estirpes do *A. marginale* geneticamente heterogêneas. Na região onde o presente estudo foi realizado, o carrapato *R. (B.) microplus* realiza entre três e cinco gerações por ano (KASAI et al., 2000), podendo os animais infectarem-se por mais de uma estirpe do *A. marginale* ao longo do tempo e, durante o processo de alimentação do carrapato, transmiti-las para um novo hospedeiro. Curiosamente, esta posição de aminoácido está presente em um epítipo imunodominante de células B descrito na MSP1a do *A. marginale* (GARCIA-GARCIA et al., 2004). Estes resultados sugerem que esta repetição pode está sob pressão seletiva do sistema imune do hospedeiro e, como consequência ocorre o surgimento de novas estirpes do *A. marginale*.

O número variável de sequências repetidas encontradas na MSP1a do *A. marginale* sugere que a duplicação desta região do gene *mSP1a*, devido a recombinação homóloga, pode ocorrer como possível “teste” para propiciar vantagens competitivas às estirpes mutantes do *A. marginale* (MUTSHEMBELE et al., 2014). Assim, um rebanho pode ser infectado por diversas estirpes do *A. marginale*, sendo algumas mais e outras menos adaptadas ao hospedeiro. Porém, embora algumas estirpes do *A. marginale* possam ser mais prevalentes, isso por si só, não é indicativo de processo evolutivo ou seleção. Deste modo, três

possibilidades podem ser consideradas a fim de explicar a diversidade genética do *A. marginale*: (1) em regiões endêmicas para anaplasmose bovina, a diversidade genética do *A. marginale* tem sido associada à elevada população de vetores carrapatos vetores. No rebanho da Pesagro-Rio, circularam 19 estirpes do *A. marginale* em 20 bezerras. Os animais mostraram alta infestação por *R. (B.) microplus*, além de que os animais circularam por diferentes pastagens, portanto, foram expostos a novas populações de carrapatos e, conseqüentemente, a novas estirpes do *A. marginale*. Por outro lado, em área endêmica para anaplasmose bovina na Argentina, a baixa diversidade genética do *A. marginale* foi relacionada à baixa população de carrapatos (RUYBAL et al., 2009). Assim, a baixa infestação por carrapatos observada nos animais da fazenda Germânia explica a baixa diversidade genética do *A. marginale* na propriedade; (2) o comércio de bovinos infectados entre diferentes regiões tem sido proposto como uma fonte de diversidade genética em *A. marginale* (LEW et al., 2002). Nos dois rebanhos estudados, não foram introduzidos novos animais no plantel, limitando a possibilidade de introdução de novas estirpes do *A. marginale* e conseqüentemente, o aumento da diversidade genética; (3) e por último, rebanhos infectados por longos períodos por *A. marginale* mostraram alta diversidade genética (DE LA FUENTE et al., 2007). No presente estudo, por se tratar de áreas endêmicas, onde, tanto o patógeno quanto os vetores estão presentes, o mais provável seja que *A. marginale* circule no rebanho desde o início da implantação da atividade pecuária.

VII CONCLUSÕES

- A diversidade genética da MSP1a do *A. marginale* identificado em bezerras com até um ano de idade foi alta no rebanho bovino da Pesagro-Rio e baixa no rebanho bovino da Fazenda Germânia;
- As bezerras permaneceram infectadas por *A. marginale* durante todo o primeiro ano de vida. Neste período, os animais infectaram-se com uma ou múltiplas estirpes do *A. marginale*;
- As estirpes do *A. marginale* 4-63-27, 78-24²-25-31 e τ-10²-15 mostraram capacidade de serem transmitidas pela placenta em condições naturais;
- A estirpe do *A. marginale* α-β³-Γ mostrou capacidade de causar anaplasmose clínica e morte em bezerras do rebanho da Fazenda Germânia, ao passo que, as estirpes 4-63-27, 78-24²-25-31 e τ-10²-15 mostraram associação com doença crônica no rebanho da Pesagro-Rio;
- A alta diversidade genética do *A. marginale* observada na Pesagro-Rio pode está associada a estirpes menos virulentas (4-63-27, 78-24²-25-31 e τ-10²-15) e a baixa diversidade genética do *A. marginale* observada na Fazenda Germânia pode estar associada a estirpes mais virulentas (α-β³-Γ).

VIII. REFERÊNCIAS

ALLRED, D.R.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; LEIB, S.R.; HARKINS, T.M.; MCELWAIN, T.F.; BARBET, A.F. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization, sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.87, n.8, p.3220–3224, 1990.

ALMAZÁN, C.; MEDRANO, C.; ORTIZ, M.; DE LA FUENTE J. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.158, n.1-2, p.103-109, 2008.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, San Diego, v.215, n.3, p.403-410. 1990.

ANDRADE, G.M.; MACHADO, R.Z.; VIDOTTO, M.C.; VIDOTTO, O. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the Jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v.1026, n.1, p.257–266, 2004.

ANISIMOVA, M.; GASCUEL, O. Approximate likelihood, ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. **Systematic Biology**, Carbondale, v.55, n.4, p.539-552, 2006.

ARAÚJO, F.R.; LEAL, C.R.B.; MADRUGA, C.R.; MIGUITA, M.; CARVALHO, E.L.L. Levantamento sorológico para *Anaplasma marginale* em duas microregiões do Estado da Bahia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.4, n.2, p.187, 1995.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; BASTOS, P. A. S.; MARQUES, A. P. C. Freqüência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v.50, n.3, p.243-246, 1998.

ARAÚJO, F.R.; MADRUGA, C.R.; SOARES, C.O.; KESSLER, R.H. progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira, Seropédica**, v.23, n.4, p.139-148, 2003.

AUBRY, P.; GEALE, D.W. A review of bovine anaplasmosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, Malden, v.58, n.1, p.1-30, 2011.

BARBET, A.F.; ALLRED, D.R. The msp1 beta multigene family of *Anaplasma marginale*: nucleotide sequence analysis of an expressed copy. **Infection and Immunity**, Washington, v.59, n.3, p.971–996, 1991.

BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; SALIKI, J.T. Effect of tetracycline on development of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.107, n.1-2, p.115–126, 2002.

BLOUIN, E.F.; SALIKI, J.T.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J.C.; KOCAN, K.M. Antibodies to *Anaplasma marginale* major surface proteins 1a and 1b inhibit infectivity for cultured tick cells. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.111, n.2-3, p.247–260, 2003.

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

BRAYTON, K.A.; KAPPEMEYER, L.S.; HERNDON, D.R.; DARK, M.J.; TIBBALS, D.L.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; KNOWLES, D.P., JR. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. **Proceedings of the National Academy**

of Sciences of the United States of America, Washington, v.102, n.1, p.844–849, 2005.

BROWN, W.C.; SHKAP, V.; ZHU, D.; MCGUIRE, T.C.; TUO, W.; MCELWAIN, T.F.; PALMER, G.H. CD4⁺ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. **Infection Immunology**, Washington, v.66, n.11, p. 5406-5413, 1998.

BROWN, W.C.; MCGUIRE, T.C.; ZHU, D.; LEWIN, H.A.; SOSNOW, J.; PALMER, G.H. Highly conserved regions of the immunodominant major surface protein 2 of the genogroup II ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* are rich in naturally derived CD4⁺ T lymphocyte epitopes that elicit strong recall responses. **The Journal Immunology**, Rockville Pike, v.166, n.2, p.1114-1124, 2001a.

BROWN, W.C.; PALMER, G.H.; LEWIN, H.A.; MCGUIRE, T.C. CD4⁽⁺⁾ T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. **Infection and Immunity**, Washington, v.69, n.11, p.6853–6862, 2001b.

BRYANT, J.; CHEWAPREECHA, C.; BENTLEY, S.D. Developing insights into the mechanisms of evolution of bacterial pathogens from whole-genome sequences. **Future Microbiology**, London, n.7, v.1, p.1283–1296, 2012.

CABEZAS-CRUZ, A.; PASSOS, L.M.F.; LIS, K.; KENNEIL, R.; VALDÉS, J.J.; FERROLHO, J.; TONK, M.; POHL, A.E.; GRUBHOFFER, L.; ZWEYGARTH, E.; SHKAP, V.; RIBEIRO, M.F.B.; ESTRADA, PEÑA, A.; KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J. Functional and Immunological Relevance of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a Sequence and Structural Analysis. **Plos One**. San Francisco, v.8, n.6, p.1-13, 2013.

CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; CECI, L.; BUONAVOGLIA, C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real, time PCR. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.124, n.1-2, p.107-114, 2007.

CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.17, n.4, p.540-552, 2000.

CHEVENET, F.; BRUN, C.; BAÑULS, A.L.; JACQ, B.; CHISTEN, R. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. **BMC Bioinformatics**, London, v.7, n.1, p.439, 2006.

DARLINGTON, P.B. Anaplasmosis in cattle (Galziete) found to exist in Kansas. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Washington, v.7, n.1, p.39–41, 1926.

DE LA FUENTE, J.; HIDALGO, Y.; OCHAGAVIA, M.E.; MUZIO, V.; RODRÍGUEZ, M.P. Analysis of enterovirus sequences recovered from the cerebrospinal fluid of patients with epidemic neuropathy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v.93, n.2, p.153–161, 1999.

DE LA FUENTE, J.; GARCIA, GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; RODRÍGUEZ, S.D.; GARCIA, M.A.; KOCAN, K.M. Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Animal Health Research Reviews**, London, v.2, n.2, p.163–173, 2001a

DE LA FUENTE, J.; GARCIA, GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. **International Journal for Parasitology**. Oxford, v.31, n.2, p.145–153, 2001b.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R.; KOCAN, K.M. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.97, n.1, p.65–76, 2001c

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; GARCIA-GARCIA, J.C.; RODRÍGUEZ, S.D.; GARCÍA, M.A.; GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J.; FRICHE PASSOS, L.M.; BARBOSA RIBEIRO, M.F.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Anaplasmataceae) based on major surface protein sequences. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.88, n.3, p.275-285, 2002.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; PRADO, T.; KOCAN, K.M. *Anaplasma marginale* major surface protein 1a genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.4, p. 1609–1616, 2003.

DE LA FUENTE, J.; PASSOS, L.M.F.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; RIBEIRO, M.F.B.; FACURY, FILHO, E.J.; KOCAN, K.M. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.121, n.3-4, p.307–316, 2004.

DE LA FUENTE, J.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; TUMINO, G.; FURLA, R.; ALMAZAN, C.; KOCAN, K.M. Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.133, n.4, p.357-362, 2005a.

DE LA FUENTE, J.; LEW, A.; LUTZ, H.; MELI, M.L.; HOFMANN, LEHMANN, R.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; MANGOLD, A.J.; ALMAZÁN, C.; NARANJO, V.; GORTÁZAR, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; GARCÍA, PÉREZ, A.L.; BARRAL, M.; OPORTO, B.; CECI, L.; CARELLI, G.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for

anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Animal Health Research Reviews**, London, v.6, n.1, p.75–89, 2005b.

DE LA FUENTE, J.; RUYBAL, P.; MTSHALI, M.S.; NARANJO, V.; SHUQING, L.; MANGOLD, A.J.; RODRÍGUEZ, S.D.; JIMÉNEZ, R.; VICENTE, J.; MORETTA, R.; TORINA, A.; ALMAZÁN, C.; MBATI, P.M.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; FARBER, M.; ROSARIO, CRUZ, R.; GORTAZAR, C.; KOCAN, K.M. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.119, n.2-4, p.382–390, 2007.

DIKMANS, G. The transmission of anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.11, n. 1, p.5–16, 1950.

DOUGLAS, J. W.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary hematology**. 6ed. Wiley Blackwell, 2010. 1232p.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in families Rickettsiaceae and Anasplamataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "EGH agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, n.6, p.2145- 2165, 2001.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.32, n.5, p.1792-1797, 2004.

ERIKS, I. S.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; ALLRED, D. R.; BARBET, A. F. Detection and qualitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.27, n.2, p.279-284, 1989.

ERIKS, I.S.; STILLER, D.; PALMER, G.H. Impact of Persistent *Anaplasma marginale* Rickettsemia on Tick Infection and Transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.31, n.8, p.2091-2096, 1993.

ESTES, D.M.; CLOSSER, N.M.; ALLEN, G.K. IFN- γ stimulates IgG₂ production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. **Cell Immunology**, London, v.154, n.2, p.287-295, 1994.

ESTRADA-PEÑA, A.; NARANJO, V.; ACEVEDO, WHITEHOUSE, K.; MANGOLD, A.J.; KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J. Phylogeographic analysis reveals association of tick, borne pathogen, *Anaplasma marginale*, MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. **BMC Biology**, London, v.7, n.57, p.1-13, 2009.

EWING, S.A., 1981. **Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods**. In: Hidalgo, R.J., Jones, E.W. (Eds.), Proc. 7th Nat. Anaplasmosis Conf., Mississippi State University, MS, pp. 395–423.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). **Cladistics**. Malden, v.5, p.164-166, 1989.

FUTSE, J.E.; UETI, M.W.; KNOWLES, D.P.; PALMER, G.H. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.8, p.3829–3834, 2003.

FUTSE, J.E.; BRAYTON, K.A.; KNOWLES, D.P.; PALMER, G.H. Structural basis for segmental gene conversion in generation of *Anaplasma marginale* outer membrane protein variants. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.57, n.1, p.212–221, 2005.

GALE, K. R.; LEATCH, G.; DE VOS, A. J.; JORGENSEN, W. K. *Anaplasma marginale*: effect of challenge of cattle with varying doses of infected erythrocytes. **International Journal Parasitology**, Cambridge, v.26, n.12, p.1417-1426, 1996.

GARCIA-GARCIA, J.C.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F.; HALBUR, T.; ONET, V.C.; SALIKI, J.T. Mapping of B, cell epitopes in the N, terminal repeated peptides of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam v.98, n.3-4, p.137–151, 2004.

GARCIA-BORONAT, M.; DIEZ-RIVERO, C.M.; REINHERZ, E.L.; RECHE, P.A. PVS: a webserver for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery. **Nucleic acids research**, London, v.36, n.1, p.35–41, 2008.

GRAU, H.E.G.; FILHO, N.A.C.; PAPENN, F.G.; FARIAS, N.A.R. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.22, n.2, p.189-193, 2013.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA-BORJA, G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.21, n.125, n.1, p.8-10, 2002.

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.57, n.1, p.109-119, 1995.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, Oxford, v.52, n.5, p.696-704, 2003.

HERRERO, M.V.; PEREZ, E.; GOFF, W.L.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D.P.; MCELWAIN, T.F.; ALVAREZ, V.; ALVAREZ, A.; BUENING, G.M. Prospective study for the detection of *Anaplasma marginale* Theiler, 1911 (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Costa Rica. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v.849, n.1, p.226-233, 1998.

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**, Oxford, v.28, n.3, p.85-89, 2012.

JONSSON, N.N.; REID, S.W.J. Global climate change and vector borne diseases. Guest editorial. **Veterinary Journal**. Oxford, v.160, n.1, p.87–89, 2000.

KASAI, N.; LABRUNA, M.B.; PIRES, A.V.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A.L.; GENNARI, S.G. Dinâmica populacional de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em bovinos leiteiros mantidos em manejo de pastejo rotativo de capim, elefante. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.5, p.453-458, 2000.

KATOH, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.30, n.4, p.772-80, 2013.

KIESER, S.T.; ERIKS, I.E.; PALMER, G.H. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Infection and Immunity**, Washington, v.58, n.4, p.1117–1119, 1990.

KINDT, T.J., GOLDSBY, R.A., OSBORNE, B.A., KUBY, J. 2007. **Kuby Immunology**. New York: W.H. Freeman. xxii, 574, A-531, G-512, AN-527, I-527p.

KNELLER, D.G.; COHEN, F.E.; LANGRIDGE, R. Improvements in protein secondary structure prediction by an enhanced neural network. **Journal of Molecular Biology**, Cambridge, v.214, n.1, p.171-182, 1990.

KOCAN, K.M. Development of *Anaplasma marginale* in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. In: Sauer, J.R., Hair, J.A. (Eds.), **Morphology, Physiology and Behavioral Ecology of Ticks**. Ellis Horwood Ltd., England, p. 472–505, 1986.

KOCAN, K.M.; GOFF, W.L.; STILLER, D.; CLAYPOOL, P.L.; EDWARDS, W.; EWING, S.A.; HAIR, J.A.; BARRON, S.J. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible cattle. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v.29, n.4, p.657–668, 1992a.

KOCAN, K.M.; STILLER, D.; GOFF, W.L.; CLAYPOOL, P.L.; EDWARDS, W.; EWING, S.A.; MCGUIRE, T.C.; HAIR, J.A.; BARRON, S.J. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from infected to susceptible cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.5, n.4, p.499–507, 1992b.

KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A.A.; MELÉNDEZ, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.16, n.4, p.698–712, 2003.

KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E.F.; GARCIA-GARCIA, J.C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, Oxford, v.129, Supl.1, p.285–300, 2004.

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

KUTTLER, K.L. Anaplasma infections in wild and domestic ruminants: a review. **Journal of Wildlife Diseases**, Oxford, v.20, n.1, p.12–20, 1984.

LEW, A.E.; BOCK, R.E.; MINCHIN, C.M.; MASAKA, S. A msp1a polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.86, n.4, p.325–335, 2002.

MACHADO, R.Z.; MONTASSIER, H.J.; PINTO, A.A.; LEMOS, E.G.; MACHADO, M.R.F.; VALADÃO, I.F.F.; BARCI, L.G.; MALHEIROS, E.B. An enzyme, linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection on antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.71, n.1, p.17-26, 1997.

MADRUGA, C.R.; KESSLER, R.H.; GOMES, A.; SCHENK, M.A.M.; ANDRADE D.F. Níveis de anticorpos e riquetsemia de *A. marginale* em área enzoótica, nos bezerros da raça Nelore, Ibagé e cruzamentos de Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.20, n.1, p.135-142, 1985.

MADRUGA, C.R.; HONER, M.R.; ANDREOTTI, R.; ARAÚJO, F.R.; SANTARÉM, V. Prevalência de *Anaplasma marginale* em três regiões do estado da Paraíba. In: **CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA EM LÍNGUA PORTUGUESA**, 6, 1994, Salvador, BA. Anais... Bahia: Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, 1994. p.350-352.

MAHONEY D.F.; ROSS D.R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Australian Veterinary Journal**. Oxford, v.48, n.1, p.292-298, 1972.

MCGAREY, D.J.; ALLRED, D.R. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. **Infection and Immunity**, Washington, v.62, n.10, p.4587–4593, 1994.

MCGAREY, D.J.; BARBET, A.F.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; ALLRED D.R. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. **Infection and Immunity**, Washington, v.62, n.10, p.4594-4601, 1994.

MCGUIRE, T.C.; MUSOKE, A.J.; KURTTI, T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. **Immunology**, London, v.38, n.1, p.249-256, 1979.

MELO, V.S.P.; PASSOS, L.M.F.; FACURY-FILHO, E.J.; SATURNINO, H.M.; RIBEIRO, M.F.B. Natural infection of calves by *Anaplasma marginale* in dairy herds of the Metalúrgica Region, Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.21, n.4, p.146-150, 2001.

MOLAD, T.; FLEIDROVICH, L.; MAZUZ, M.; FISH, L.; LEIBOVITZ, B.; KRIGEL, Y.; SHKAP, V. Genetic diversity of major surface protein 1a of *Anaplasma marginale* in beef cattle. **Veterinary Microbiology**, Iowa, v.136, n.1-2, p.54–60, 2009.

MTSHALI, M.S.; DE LA FUENTE, J.; RUYBAL, P.; KOCAN, K.M.; VICENTE, J.; MBATI, P.A.; SHKAP, V.; BLOUIN, E.F.; MOHALE, N.E.; MOLOI, T.P.; SPICKETT, A.M.; LATIF, A.A. Prevalence and genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains in cattle in South Africa. **Zoonoses and Public Health**, Berlin, v.54, n.1, p.23–30, 2007.

MUTSHEMBELE, A.M.; CABEZAS, CRUZ, A.; MTSHALI, M.S.; THEKISOE, O.M.M.; GALINDO, R.C.; DE LA FUENTE, J. Epidemiology and evolution of the genetic variability of *Anaplasma marginale* in South Africa. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, Amsterdam, v.5, n.6, p.624-631, 2014.

NICHOLLS, M.J.; IBATA, G.; RODAS, F.V. Prevalence of antibodies to *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in dairy cattle in Bolivia. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v.12, N.1, p.48–49, 1980.

OLIVEIRA, A.A.; PEDREIRA, P.A.S.; ALMEIDA, M.F.R.S. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasmosose no estado de Sergipe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.44, n.5, p.377-386, 1992.

PALMER, G.H. *Anaplasma* vaccines. In: Wright, I.G. (Ed.), **Veterinary Protozoan and Hemoparasite Vaccines**. p.1–29, 1989.

PALMER, G.H.; RURANGIRWA, F.R.; KOCAN, K.M.; BROWN, W.C. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.15, n.1, p.253–300, 1999.

PALMER, G. H.; W. C. BROWN, W. C.; RURANGIRWA, F. R. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. **Microbes and Infection**, Paris, v.2, n.1, p.167–176, 2000.

PALMER, G.H.; RURANGIRWA, F.R.; MCELWAIN, T.F. Strain composition of the Ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.2, p.631–635, 2001.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n.7, p.5381–5384, 2004.

PALMER, G.H.; BRAYTON, K.A. Antigenic variation and transmission fitness as drivers of bacterial strain structure. **Cellular Microbiology**, Oxford, v.15, n.12, p. 1969-1975, 2013.

PIERLÉ, S.A.; ROSSHANDLER, I.I.; KERUDIN, A.A.; SAMBONO, J.; LEW-TABOR, A.; ROLLS, P.; RANGEL-ESCARÉÑO, C.; BRAYTON, K.A. Genetic Diversity of Tick-Borne Rickettsial Pathogens; Insights Gained from Distant Strains. **Pathogens**, Basel, v.3, n.1, p.57-72, 2014.

POHL, A.E.; CABEZAS-CRUZ, A.; RIBEIRO, M.F.B.; SILVEIRA, J.A.G.; SILAGHI, C.; PFISTER, K.; PASSOS, L.M.F. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais. Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.22, n.1 p.129-135, 2013.

POTGIETER, F.T.; STOLTSZ, W.H. Anaplasmosis. In: Coetzer, J.A.W., Thompson, G.R., Tustin, R.C. (Eds.), **Infectious Diseases of Livestock- With Special Reference to Southern Africa**. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, 1994, p.408–430.

POTGIETER, F.T.; VANRENSBURG, L. The persistence of colostral *Anaplasma marginale* antibodies and incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. **The Onderstepoort journal of veterinary research**, Durbanville, v.54, n.4, p.557-560, 1987.

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

RIBEIRO, M. F. B.; PATARROYO, J. H. S.; SANTOS, J. L.; FARIA, J. E. Epidemiologia da anaplasmoze bovina no estado de Minas Gerais. I – Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.36, n.4, p.425-432, 1984.

RIBEIRO, M.F.B.; FACURI FILHO, E.J.; PASSOS, L.M.F.; SATURNINO, H.M.; MALACCO, M. A. Uso de inóculo padronizado de *Anaplasma marginale* e da quimioprevenção no controle da anaplasmosose bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.1, p.21-26, 2003.

RISTIC, M. Bovine anaplasmosis. In: Kreier, J. **Parasitic Protozoa**. (Ed.), v.4. Academic Press, New York, 1977, p.235–249.

RURANGIRWA, F.R.; STILLER, D.; FRENCH, D.M.; PALMER, G.H. Restriction of major surface protein 2 (MSP2) variants during tick transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.96, n.2, p.3171–3176, 1999.

RUYBAL, P.; MORETTA, R.; PEREZ, A.; PETRIGH, R.; ZIMMER, P.; ALCARAZ, E.; ECHAIDE, I.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; FARBER, M. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.162, n.1-2, p.176–180, 2009.

SANGER, F.; NIKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.74, n.12, p.5163-5169, 1977.

SCOLES, G.A.; UETI, M.W.; PALMER, G.H. Variation among geographically separated populations of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) in midgut susceptibility to *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v.42, n.2, p.153-162, 2005.

SCOLES, G.A.; MCELWAIN, T.F.; RURANGIRWA, F.R.; KNOWLES, D.P.; LYSYK, T.J. A Canadian bison isolate of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) is not transmissible by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae),

whereas ticks from two Canadian *D. andersoni* populations are competent vectors of a U.S. strain. **Journal of medical entomology**, Lanham, v.43, n.5, p.971-975, 2006.

SCOLES, G.A.; UETI, M.W.; NOH, S.M.; KNOWLES, D.P.; PALMER, G.H. Conservation of transmission phenotype of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) strains among *Dermacentor* and *Rhipicephalus* ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, Lanham, v. 44, p.3, p.484-91, 2007.

SHANNON, C.E. The mathematical theory of communication. **The Bell System Technical Journal**, New York, v.27, n.1, p.379–423, 1948.

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

SILVA, J.B.; GONÇALVES, L.R.; VARANI, A.M.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* studied longitudinally under natural transmission conditions in Rio de Janeiro, Brazil. **Ticks Tick Borne Diseases**, Amsterdam, v.6, n.4, p.499–507, 2015a.

SILVA, J.B.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis, São Paulo state, Brazil. **Ticks Tick Borne Diseases**, Amsterdam, v.x, n.x, p.xxx-xxx, 2015b.

SMITH, R.D.; LEVY, M.G.; KUHLENSCHMIDT, M.S.; ADAMS, J.H.; RZECHULA, D.L.; HARDT, T.A.; KOCAN, K.M. Isolate of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.47, n.1, p.127-129, 1986.

SMITH, T.; KILBORNE, F.L. Investigation into the nature causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. Washington: USDA, 1893. 301 p. (USDA. Bulletin, 1).

SOUZA, J.C.P.; SOARES, C.O.; MADRUGA, C.R.; MASSARD, C.L. Prevalência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do médio paraíba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.2, p.309-314, 2001.

THEILER, A. *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.): A protozoon of cattle, a cause of the called gall-sickness. **The Transvaal Medicine Journal**, Pretória, v.5, n.1, p.110-111, 1910.

THEILER, A. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. **In: 1º Report of the Director of Veterinary Research**. Department of Agriculture of the Union of South Africa, p.7-46, 1911.

TUO W.; PALMER G.H.; MCGUIRE T.C.; ZHU D.; BROWN W.C. Interleukin-12 as an adjuvant promotes immunoglobulin G and type 1 cytokine recall responses to major surface protein 2 of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, n.1, p.270-280, 2002.

UETI, M.W.; TAN, Y.; BROCHAT, S.L.; CASTAÑEDA ORTIZ, E.J.; CAMACHO, NUEZ, M.; MOSQUEDA, J.J.; SCOLES, G.A.; GRIMES, M.; BRAYTON, K.A.; PALMER, G.H. Superinfection under conditions of natural with a high prevalence of pathogen strain expansion of variant diversity associated transmission. **Infection and Immunity**, Washington, v.80, n.7, p.2354-2360, 2012.

VALDEZ, R.A.; MCGUIRE, T.C.; BROWN, W.C.; DAVIS, W.C.; JORDAN, J.M.; KNOWLES, D.P. Selective in vivo depletion of CD4+ T lymphocytes with anti-CD4 monoclonal antibody during acute infection of calves with *Anaplasma marginale*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.9, n.2, p.417-424, 2002.

VIDOTTO, O.; YAMAMURA, M.H.; ANDRADE, G.M.; BARBOSA, C.S.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, M.C. Ocorrência de *Babesia bigemina*, *B. bovis*, e *Anaplasma*

marginale em rebanhos de bovinos leiteiros da região de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.4, n.2, p.184, 1995.

VIDOTTO, M.C.; VIDOTTO, O.; ANDRADE, G.M.; PALMER, G.; MCELWAIN, T.; KNOWLES, D.P. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in cattle in Paraná State, Brazil, by MSP, 5 competitive ELISA. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.849, n.1, p.424-426, 1998.

VIDOTTO, M.C.; KANO, F.S.; GREGORI, F.; VIDOTTO, O. Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Parana State, Brazil, using the msp1, alfa and msp4 genes. **Journal of Veterinary Medicine. B**, Berlin, v.53, n.9, p.404-411, 2006.

ZAUGG, J.L.; KUTTLER, K.L. Bovine anaplasmosis: in utero transmission and the immunologic significance of ingested colostral antibodies. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.45, n.3, p.440-443, 1984.

ZAUGG, J.L.; GOFF, W.L.; FOREYT, W.; HUNTER, D.L. Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *A. ovis*. **Journal of Wildlife Diseases**, oxford, v.32, n.1, p.63-66, 1996.

YBAÑEZ, A.P.; YBAÑEZ, R.H.D.; CLAVERIA, F.G.; CRUZ, FLORES, M.J.; XUANAN, X.; YOKOYAMA, N.; INOKUMA, H. High Genetic Diversity of *Anaplasma marginale* Detected from Philippine Cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.76, n.7, p.1009-1014, 2014.