

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Anaplasma* spp. EM
BOVINOS EM MAPUTO, MOÇAMBIQUE**

Simone de Jesus Fernandes
Bióloga

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Anaplasma* spp. EM
BOVINOS EM MAPUTO, MOÇAMBIQUE**

Simone de Jesus Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2018

Fernandes, Simone de Jesus
F363d Diversidade de espécies de *Anaplasma* spp. em bovinos amostrados em Maputo, Moçambique / Simone de Jesus Fernandes. – Jaboticabal, 2018
x, 73 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Marcos Rogério André
Banca examinadora: Ana Patrícia Yatsuda Natsui, Rosângela Zacarias Machado
Bibliografia

1. *Anaplasma marginale*. 2. *Anaplasma phagocytophilum*. 3. *Anaplasma platys*. 4. *Anaplasma centrale*. 5. *Anaplasma ovis*. 6. '*Candidatus Anaplasma boleense*'. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:579.881.3

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Anaplasma* spp. EM BOVINOS EM MAPUTO, MOÇAMBIQUE

AUTORA: SIMONE DE JESUS FERNANDES

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. ANA PATRÍCIA YATSUDA NATSUI
Departamento Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas-FCFRP/USP / Ribeirão Preto/SP



Profa. Dra. ROSÂNGELA ZACARIAS MACHADO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 27 de junho de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Simone de Jesus Fernandes – nascida na cidade de Guarulhos, São Paulo, em 1 de novembro de 1987. Formada em Ciências Biológicas (Bacharelado) pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Jaboticabal, São Paulo, no ano de 2015. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica pela Pró Reitoria de Pesquisa (PROPE), atuando na área de Parasitologia, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André, com o trabalho intitulado “Detecção molecular de agentes da família Anaplasmataceae e piroplasmídeos em gatos errantes e domiciliados da cidade de Campo Grande, MS”. Ingressou no curso de Mestrado em março de 2016, pelo Programa de Pós – Graduação em Microbiologia Agropecuária da FCAV/UNESP, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha saúde e por não me desamparar, mesmo em momentos de pouca fé.

Aos meus pais, pelo amor, conselhos, e por acreditarem em meus planos mais do que eu mesma.

A todos os meus familiares, pela torcida e por compreenderem momentos de ausência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Rogério André, pela oportunidade, apoio e ensinamentos desde meu período de estágio na Graduação até a Pós – Graduação.

À Prof^a Dra. Rosangela Zacarias Machado pelos ensinamentos e auxílios durante minha formação.

A todos os colegas Pós-Graduandos e Estagiários do Departamento de Patologia Veterinária, pelos ensinamentos, auxílio, amizade e bons momentos que passamos juntos.

Ao colega de laboratório Dr. Carlos António Matos, por sua amizade, pelas amostras que trabalhei durante o mestrado, e por seu auxílio.

A todas as pessoas com quem tive contato durante esta fase, e que me ajudaram durante alguma etapa de meus experimentos, ou esclareceram minhas dúvidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, e à Universidade pela oportunidade de realizar este curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 2015/14896-1) pelo apoio financeiro e suporte à realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Breve histórico do gênero <i>Anaplasma</i> sp.	3
2.2. Agentes etiológicos	4
2.2.1. <i>Anaplasma marginale</i>	4
2.2.2. <i>Anaplasma centrale</i>	5
2.2.3. <i>Anaplasma ovis</i>	6
2.2.4. <i>Anaplasma bovis</i>	7
2.2.5. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	7
2.2.6. <i>Anaplasma platys</i>	9
2.2.7. <i>Anaplasma odocoilei</i>	10
2.2.8. <i>Anaplasma capra</i>	10
2.2.9. ‘ <i>Candidatus Anaplasma boleense</i> ’	11
2.3. Diagnóstico de <i>Anaplasma</i> spp.	13
2.4. Detecção sorológica e molecular de <i>Anaplasma</i> spp. em bovinos em Moçambique	15
3. OBJETIVOS	15

3.1. Objetivo geral	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Colheita das amostras e Área de estudo	16
4.1.1. Fisiogeografia das áreas de estudo	18
4.1.2. Boane	18
4.1.3. Magude	18
4.1.4. Matutuíne	18
4.1.5. Moamba	19
4.1.6. Namaacha	19
4.2. Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA)	20
4.3. Extração de DNA	21
4.4. Reação de Amplificação para o gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	22
4.5. PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>) e <i>A. phagocytophilum</i> (gene <i>msp2</i>)	22
4.6. Ensaio de PCR convencional (cPCR) para <i>Anaplasma</i> spp. baseados nos genes 16S rRNA, <i>msp4</i> , <i>msp5</i> , e <i>groEL</i>	25
4.7. Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados	27
4.8. Análise filogenética	27
4.9. Diversidade de haplótipos de <i>Anaplasma marginale</i>	28
5. RESULTADOS	28
5.1. Detecção de anticorpos IgG anti- <i>A. marginale</i> (iELISA)	28

5.2. Ensaio de qPCR para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>) e <i>A. phagocytophilum</i> (gene <i>msp2</i>)	29
5.3. Ensaio de cPCR e inferência filogenética para <i>Anaplasma</i> spp. baseados em um fragmento do gene 16S rRNA (protocolo de Massung et al., 1998)	33
5.4. Ensaio de cPCR e inferência filogenética para <i>Anaplasma</i> spp. baseados em fragmento do gene 16S rRNA (protocolo de Zobba et al., 2014)	38
5.5. Ensaio de cPCR e inferência filogenética para <i>A. marginale</i> baseados em fragmento do gene <i>msp4</i> (De La Fuente, 2004)	42
5.6. Ensaio de cPCR e inferência filogenética para <i>A. marginale</i> baseado em fragmento do gene <i>msp5</i> (ECHAIDE et al., 1998; SINGH et al., 2012)	46
5.7. Ensaio de cPCR e inferência filogenética para <i>Anaplasma</i> sp. baseados no operon <i>groEL</i> (SUMMER et al., 1997; LOTRIC-FURLAN et al., 1998; NICHOLSON et al., 1999)	50
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÕES	59
8. REFERÊNCIAS	60

DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *Anaplasma* spp. EM BOVINOS EM MAPUTO, MOÇAMBIQUE

RESUMO – Embora espécies de *Anaplasma* spp. sejam agentes Rickettsiales altamente difundidos em ruminantes domésticos e selvagens, com ampla distribuição mundial, poucos estudos foram realizados até momento com o intuito de detectar e/ou investigar a diversidade de *Anaplasma* spp. circulantes em bovinos em Moçambique. No presente estudo, ensaios sorológicos e moleculares foram utilizados para investigar a ocorrência de *Anaplasma* spp. em 219 bovinos amostrados nos distritos de Boane, Magude, Matutuíne, Moamba e Namaacha em Maputo, Moçambique. No teste iELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*A. marginale*, 86,3% (189/219) das amostras mostraram-se soropositivas. Em ensaios de qPCR para os genes *msp1 β* de *A. marginale* e *msp2* para *A. phagocytophilum*, 97,3% (213/219) e 2,74% (6/219) dos animais mostraram-se positivos, respectivamente. A combinação de dois protocolos diferentes de cPCR baseados no gene 16S rRNA evidenciou 100% de amostras positivas para *Anaplasma* spp. Sequências de 16S rRNA filogeneticamente relacionadas a *A. platys*, *A. phagocytophilum*, ‘*Candidatus Anaplasma boleense*’, *A. centrale*, *A. marginale* e *A. ovis* foram detectadas neste estudo. Inferências filogenéticas baseadas nos genes *msp4* e *msp5* posicionaram as sequências obtidas no clado de *A. marginale*, com a evidência de circulação de 1 e 2 haplótipos diferentes para cada gene, respectivamente. *Anaplasma* sp. filogeneticamente associado a *A. platys* foi evidenciado nas análises filogenéticas baseadas nos genes 16S rRNA e *groEL*. Conclui-se que uma alta diversidade de espécies de *Anaplasma* sp. circulam em bovinos em Moçambique.

Palavras-Chave: *Anaplasma marginale*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*, ‘*Candidatus Anaplasma boleense*’

DIVERSITY OF SPECIES OF *Anaplasma* spp. IN BOVINE IN MAPUTO, MOZAMBIQUE

ABSTRACT – Although species of *Anaplasma* spp. are widespread Rickettsiales agents in domestic and wild ruminants, showing a worldwide distribution, few studies have been conducted in order to detect and/or investigate the diversity of *Anaplasma* spp. circulating in cattle in Mozambique. In the present study, serological and molecular tests were used to investigate the occurrence of *Anaplasma* spp. in 219 bovine sampled in the districts of Boane, Magude, Matutuíne, Moamba and Namaacha in Maputo, Mozambique. In the iELISA test for detection of IgG antibodies to *A. marginale*, 86.3% (189/219) of the samples were positive. In quantitative Real-time PCR tests targeting the *msp1 β* genes of *A. marginale* and *msp2* for *A. phagocytophilum*, 97.3% (213/219) and 2.74% (6/219) of the animals were positive, respectively. The combination of two different protocols of conventional PCR targeting the 16S rRNA gene evidenced 100% of positive samples for *Anaplasma* spp. Sequences of 16S rRNA phylogenetically related to *A. platys*, *A. phagocytophilum*, 'Candidatus *Anaplasma boleense*', *A. centrale*, *A. marginale* and *A. ovis* were detected in this study. Phylogenetic analysis based on *msp4* and *msp5* genes positioned the obtained sequences in the clade of *A. marginale*, with the evidence of circulation of 1 and 2 different haplotypes for each gene, respectively. *Anaplasma* sp. phylogenetically related to *A. platys* was evidenced in the phylogenetic analyses based on the 16S rRNA and *groEL* genes. In conclusion, a high diversity of *Anaplasma* species circulating in cattle in Mozambique.

Keywords: *Anaplasma marginale*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*, 'Candidatus *Anaplasma boleense*'

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Locais de colheita, raça dos animais amostrados e realização de controle de carrapatos por distritos de Maputo, Moçambique	20
Tabela 2. Descrição dos ensaios de qPCR para <i>Anaplasma marginale</i> e <i>Anaplasma phagocytophilum</i> baseados nos genes <i>msp1β</i> e <i>msp2</i> , respectivamente, utilizados no presente estudo	24
Tabela 3. Descrição das sequências de oligonucleotídeos iniciadores e condições de ciclagem utilizados nos ensaios de PCR convencional para <i>Anaplasma</i> spp.	26
Tabela 4. Soroprevalência para <i>Anaplasma marginale</i> em bovinos amostrados em cinco distritos na cidade de Maputo, Moçambique	29
Tabela 5. Parâmetros dos ensaios de qPCR para <i>Anaplasma marginale</i> (<i>msp1β</i>) e <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (<i>msp2</i>)	30
Tabela 6. Porcentagens de identidade (BLAST) das sequências do gene 16S rRNA de <i>Anaplasma</i> spp. obtidas pelo protocolo de Massung et al. (1998)	34
Tabela 7. Valores de sinal filogenético para os diferentes genes utilizados no estudo inferidos pelo software TreePuzzle	35
Tabela 8. Matriz de identidade para as sequências <i>msp4</i> de <i>Anaplasma marginale</i> obtidas a partir de amostras de sangue de bovinos de Maputo, Moçambique	43
Tabela 9. Análise de haplótipos para os genes <i>msp4</i> e <i>msp5</i> de <i>Anaplasma marginale</i>	47
Tabela 10. Matriz de identidade para as sequências <i>msp5</i> de <i>Anaplasma marginale</i> obtidas a partir de amostras de sangue de bovinos de Maputo, Moçambique	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Inclusões de espécies de <i>Anaplasma</i> em suas respectivas células-alvo	12
Figura 2. Mapa com a localização de Moçambique no continente africano, e área dos locais de colheita de sangue e soro de bovinos em distritos de Maputo	17
Figura 3. Curva-padrão (A) e Curvas de amplificação (B) da qPCR para <i>A. marginale</i> baseada no gene <i>msp1β</i> . A figura (A) representa a curva-padrão do número de ciclos (Cq) versus as diluições seriadas dos padrões com diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo a sequência-alvo de 95 pb de <i>msp1β</i> de <i>A. marginale</i> (2,0 x 10 ⁷ cópias/ μL a 2,0 x 10 ⁰ cópias/ μL). A figura B apresenta os ciclos de amplificação das amostras-teste (em azul) e da diluição seriada de um plasmídeo contendo a sequência-alvo de <i>A. marginale</i> (em vermelho)	31
Figura 4. Curva-padrão (A) e Curvas de amplificação (B) da qPCR para <i>A. phagocytophilum</i> baseada no gene <i>msp2</i> . A figura (A) representa a curva-padrão do número de ciclos (Cq) versus as diluições seriadas dos padrões com diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo a sequência-alvo de 122 pb de <i>msp2</i> de <i>A. phagocytophilum</i> (2,0 x 10 ⁷ cópias/ μL a 2,0 x 10 ⁰ cópias/ μL). A figura B apresenta os ciclos de amplificação das amostras-teste (em azul, amostras negativas; em verde amostras positivas) e da diluição seriada de um plasmídeo contendo a sequência-alvo de <i>A. marginale</i> (em vermelho)	32
Figura 5. Resultados parciais da eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando os amplicómeros relativos à PCR para <i>Anaplasma</i> sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores gE2 e gE9f. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaletas 2 a 15, e 17 a 27: amostras positivas; Canaleta 16: amostra negativa; Canaleta 1: controle positivo (<i>A. phagocytophilum</i>), Canaleta 28: controle negativo (água esterilizada ultrapura)	33
Figura 6. Posição filogenética das sequências de <i>Anaplasma</i> sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene 16SrRNA. A árvore foi construída utilizando o método de análise de MV empregando o modelo evolutivo GTR+F+G4. Os números na árvore indicam valores de bootstrap para os pontos de ramificação. As sequências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Sequências de <i>Ehrlichia</i> sp. foram utilizadas como grupo externo	36

Figura 7. Posição filogenética das sequências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene 16SrRNA. A árvore foi construída utilizando o método de análise BI empregando o modelo evolutivo GTR+F+G4. Os números na árvore indicam valores de probabilidade posterior para os pontos de ramificação. As sequências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Sequências de *Ehrlichia* sp. foram utilizadas como grupo externo **37**

Figura 8. Resultados parciais da eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando os amplicómeros relativos à PCR para *Anaplasma* sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores AnapIspF e AnapIR3. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaletas 2 a 27 amostras positivas; Canaleta 1: controle positivo (*A. phagocytophilum*), Canaleta 28: controle negativo (água esterilizada ultrapura) **38**

Figura 9. Posição filogenética das sequências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene 16SrRNA. A árvore foi construída utilizando o método de análise de MV empregando o modelo evolutivo GTR+F+G4. Os números na árvore indicam valores de bootstrap para os pontos de ramificação. As sequências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Sequências de *Ehrlichia* sp. foram utilizadas como grupo externo **40**

Figura 10. Posição filogenética das sequências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene 16SrRNA. A árvore foi construída utilizando o método de análise BI empregando o modelo evolutivo GTR+F+G4. Os números na árvore indicam valores de probabilidade posterior para os pontos de ramificação. As sequências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Sequências de *Ehrlichia* sp. foram utilizadas como grupo externo **41**

Figura 11. Resultados parciais da eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os amplicómeros relativos à PCR para *Anaplasma marginale* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores MSP45 e MSP43. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaletas 2 a 11, 13 a 17 e 19 e 20: amostras positivas; canaletas 12 e 18: negativas. Canaleta 1: controle positivo (*A. marginale*), e 22: controle negativo (água esterilizada ultrapura) **42**

Figura 12. Posição filogenética das sequências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene *msp4*. A árvore foi construída utilizando o método de análise BI empregando o modelo evolutivo K2P+G4. Os números na árvore indicam valores de probabilidade posterior para os pontos de ramificação. As sequências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Sequências de *A. phagocytophilum* foram utilizadas como grupo externo **44**

- Figura 13.** Posição filogenética das sequências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene *msp4*. A árvore foi construída utilizando o método de análise de MV empregando o modelo evolutivo K2P+G4. Os números na árvore indicam valores de bootstrap para os pontos de ramificação. As sequências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Sequências de *A. phagocytophilum* foram utilizadas como grupo externo 45
- Figura 14.** Resultados parciais de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os amplicómeros relativos à PCR para *Anaplasma marginale* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores Amar *msp5* eR e Amar *msp5* iF. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaletas 1 a 5 amostras positivas reamplificadas e com banda única 46
- Figura 15.** Posição filogenética das sequências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene *msp5*. A árvore foi construída utilizando o método de análise de MV empregando o modelo evolutivo TIM3+G. Os números na árvore indicam valores de bootstrap para os pontos de ramificação. As sequências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Sequências de *A. phagocytophilum* foram utilizadas como grupo externo 48
- Figura 16.** Posição filogenética das sequências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene *msp5*. A árvore foi construída utilizando o método de análise BI empregando o modelo evolutivo TIM3+G. Os números na árvore indicam valores de probabilidade posterior para os pontos de ramificação. As sequências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Sequências de *A. phagocytophilum* foram utilizadas como grupo externo 49
- Figura 17.** Resultados parciais da Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os amplicómeros relativos à PCR para *Anaplasma* sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores HS43 e HSVR: Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaletas 3 e 4: amostras positivas, canaletas 2, e de 5 a 12: amostras negativas. Canaleta 1: controle positivo (*A. phagocytophilum*) e 14: controle negativo (água esterilizada ultrapura) 50
- Figura 18.** Posição filogenética da sequência de *Anaplasma* sp. detectada em bovino da província de Maputo, Moçambique; com base no gene *groEL*. A árvore foi construída utilizando o método de análise BI empregando o modelo evolutivo GTR+I+G. Os números na árvore indicam valores de probabilidade posterior para os pontos de ramificação. A sequência obtida no estudo encontra-se destacada em negrito. Sequências de *Ehrlichia* sp. foram utilizadas como grupo externo 51

Figura 19. Posição filogenética da sequência de *Anaplasma* sp. detectada em bovino da província de Maputo, Moçambique; gene *groEL*. A árvore foi construída utilizando o método de análise de MV e empregando o modelo evolutivo GTR+I+G. Os números na árvore indicam valores de bootstrap para os pontos de ramificação. A sequência obtida no estudo encontra-se destacada em negrito. Sequências de *Ehrlichia* sp. foram utilizadas como grupo externo ...

1. INTRODUÇÃO

As bactérias Gram-negativas do gênero *Anaplasma* sp. estão inseridas na Ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001). São parasitas intracelulares transmitidos biologicamente pela picada de carrapatos durante o repasto sanguíneo, e suas diferentes linhagens podem expressar tropismos por células sanguíneas específicas (SILAGHI et al., 2017). Diversas espécies de carrapatos estão aptas a atuar como vetores, e devido a vasta gama de potenciais hospedeiros vertebrados, os agentes Anaplasmataceae ameaçam a saúde de animais e seres humanos. Considerando os resultados de estudos recentes, é possível que a constante interferência do homem na natureza, aliada às atuais mudanças climáticas, estejam contribuindo para o aumento da dispersão dos vetores, e conseqüentemente, favorecem a disseminação de *Anaplasma* spp. em localidades outrora com baixa incidência dos referidos agentes.

Os impactos negativos ocasionados pelos variados tipos de anaplasmoses por todo o mundo, têm despertado o interesse por novos estudos. Neste sentido, a comunidade científica vem se preocupando em planejar ações frente aos efeitos desta doença, seja devido a prejuízos econômicos ao setor pecuário (como queda na produção de leite e carne, e gastos com tratamentos de animais infectados) ou no que tange à saúde pública, já que existe um potencial risco de infecção para os seres humanos, com o agente da anaplasmoses granulocítica humana.

Em Moçambique a ocorrência de anaplasmoses bovina foi agravada após tentativas de melhorias no setor pecuário, que incluíram a importação de animais de países vizinhos sem o acompanhamento do *status* sanitário (SIMUUNZA et al., 2011; TEMBUE et al., 2011). Apesar das conseqüências da anaplasmoses bovina serem conhecidas e amplamente divulgadas na literatura científica, poucos estudos até o momento investigaram a ocorrência de *Anaplasma* spp. em ruminantes de Moçambique. Neste aspecto, anticorpos anti-*A. marginale* foram detectados em bovinos no país por Alfredo et al. (2005) e Tembue et al. (2011). Ainda, DNA de *Anaplasma* sp. foi detectado em bovinos na província de Maputo por Bekker et al. (2002) e Martins et al. (2010). Mais recentemente, Machado et al. (2016) detectaram DNA de *Anaplasma* sp. relacionado a *A. centrale*, *A. marginale*, *A. platys* e *A.*

phagocytophilum em búfalos selvagens africanos na região central do país.

A fim de contribuir para a ampliação do conhecimento sobre estes organismos, o estudo em tela se propôs a investigar a ocorrência e diversidade genética de *Anaplasma* spp. em bovinos amostrados em cinco distritos de Maputo, Moçambique.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Breve histórico do gênero *Anaplasma* sp.

O gênero *Anaplasma* sp. foi descrito em 1910 na África do Sul por Sir Arnold Theiler, que ao visibilizar eritrócitos de bovinos enfermos, muitos deles acometidos por babesiose, encontrou estruturas nas margens destas células (*Anaplasma marginale*) e concluiu tratar-se de um outro agente causador de enfermidade, ainda desconhecido (KOCAN et al., 2010). O referido gênero engloba bactérias Gram-negativas, imóveis e intracelulares obrigatórias, as quais se localizam em vacúolos intracitoplasmáticos formando estruturas aglomeradas denominadas mórulas (DUMLER et al., 2001; SILAGHI et al., 2017). Diversas espécies de carrapatos vetores e hospedeiros vertebrados estão envolvidos no ciclo de vida de *Anaplasma* spp. sendo estes últimos considerados reservatórios destes agentes, uma vez que desenvolvem infecções persistentes e atuam como fonte de infecção para os vetores artrópodes (KIESER et al., 1990; KOCAN et al., 1992; CASTRO et al., 2001; VILLAR et al., 2016; BATTILANI et al., 2017). Após a alimentação dos carrapatos em hospedeiros infectados por *Anaplasma* spp., ocorre a primeira replicação das bactérias no epitélio do intestino médio dos vetores. Posteriormente, as bactérias migram para o epitélio das glândulas salivares, onde ocorre um segundo ciclo de replicação, de maneira que possam ser transmitidas pela saliva quando o carrapato se alimenta no próximo hospedeiro vertebrado (UETI et al., 2009). O gênero *Anaplasma* pertence à Ordem Rickettsiales, a qual sofreu um processo de reclassificação proposta por Dumler et al. (2001), baseada em análises moleculares dos genes 16S RNA ribossomal (16S rRNA), “heat shock operon” (*groEL*), e genes de proteínas de superfície. Nesta ocasião, a ordem Rickettsiales foi dividida em duas famílias: Rickettsiaceae (organismos intracitoplasmáticos pertencentes aos gêneros *Rickettsia* e *Orientia*) e Anaplasmataceae (organismos localizados em vacúolos intracitoplasmáticos, pertencentes aos gêneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*). O gênero *Anaplasma*, até então, albergava as espécies *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis*, sendo estes, patógenos específicos de ruminantes. Com a nova reclassificação (DUMLER et al., 2001) foram incluídas ao gênero *Anaplasma* as

seguintes espécies: *A. platys* (anteriormente *E. platys*), *A. bovis* (anteriormente *E. bovis*), e *A. phagocytophilum*. Esta última espécie englobou os agentes anteriormente denominados *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* e o agente da HGE (Erlíquiose Granulocítica Humana). Recentemente novas espécies foram propostas ao gênero *Anaplasma*: *A. odocoilei* (TATE et al., 2013) e *A. capra* (LI et al., 2015). Ademais, o crescente uso de técnicas moleculares para detecção de patógenos tem propiciado a descrição de novos agentes. A exemplo disto, Ybañez et al. (2012) identificaram uma possível nova espécie de *Anaplasma* sp. relacionada à *A. phagocytophilum*, detectada em *Cervus nippon* oriundos de Hokkaido, no Japão. Guo et al. (2016), por sua vez, propuseram a inclusão de uma nova espécie no gênero sob estudo, '*Candidatus Anaplasma boleense*', a qual foi detectada em mosquitos na China.

2.2. Agentes etiológicos

2.2.1. *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale, designada espécie-tipo para o gênero *Anaplasma*, é um patógeno que infecta hemácias de ruminantes (**Figura 1A**), causando a anaplasmoze bovina. Outros animais além de bovinos podem ser infectados por este patógeno, como por exemplo cervo-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), búfalos-d'água (*Bubalus bubalis*), bisão americano (*Bison bison*), cervo-de-cauda-negra (*Odocoileus hemionus columbianus*) (KOCAN et al., 2010; BATTILANI et al., 2017), cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) (MACHADO et al., 2006; SILVEIRA et al., 2012), veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) (PICOLATO et al., 2010), veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) (SILVEIRA et al., 2012), e búfalos africanos (*Syncerus caffer*) (MACHADO et al., 2016).

A distribuição de *A. marginale* é mundial, embora esteja presente principalmente em regiões tropicais. Nos últimos anos vem se observando um aumento em sua propagação por influência do aquecimento global, o que propicia um maior deslocamento de vetores. Outro fator que contribui para a disseminação deste agente envolve a circulação de animais infectados de áreas endêmicas para regiões

não endêmicas (KOCAN et al., 2010; BATTILANI et al., 2017). No mínimo vinte espécies diferentes de carrapatos estão aptas à transmissão biológica de *A. marginale*, em especial àquelas pertencentes aos gêneros *Dermacentor*, em regiões temperadas, e *Rhipicephalus* em regiões tropicais (KOCAN et al., 2003; BATTILANI et al., 2017). Outras formas de transmissão são possíveis de ocorrer, tais como a transplacentária, que resulta em bezerros com infecções persistentes (KOCAN et al., 2015), e a transmissão mecânica, fundamental na ausência de vetores biológicos e que necessita da atuação de insetos hematófagos (*Stomoxys calcitrans* e dípteros tabanomorphos). Neste sentido, Scoles et al. (2005) demonstraram que a estirpe “Flórida” de *A. marginale* é transmitida de forma eficaz por transmissão mecânica. Acredita-se que a propagação de *A. marginale* em algumas áreas dos Estados Unidos, assim como América Latina e África, deve-se a esta via de transmissão (KOCAN et al., 2010). Por fim, existe também a possibilidade de transmissão mecânica através de fômites contaminados com sangue infectado (KOCAN et al., 2003). Em relação à Moçambique, os vetores conhecidos para *A. marginale* são espécies de carrapatos pertencentes aos gêneros *Rhipicephalus* e *Hyalomma*. Além disto, a transmissão mecânica por outros artrópodes e por fômites contaminados com sangue também são importantes neste país (MARTINS et al., 2008; TEMBUE et al., 2011). Em relação aos sinais clínicos, a fase aguda da anaplasmoze bovina está associada à febre, emagrecimento, abortamento, diminuição da produção de leite, e ocasionalmente morte. Em caso de recuperação do animal, este permanecerá infectado de forma crônica, tornando-se reservatório para a transmissão biológica ou mecânica do parasita (KOCAN et al., 2003).

2.2.2. *Anaplasma centrale*

Anaplasma centrale é um agente patogênico que tem como característica formar inclusões na região central de eritrócitos infectados (**Figura 1B**) (POTGIETER; VAN RENSBURG, 1987; BATTILANI et al., 2017). Esta bactéria também infecta ruminantes e encontra-se distribuída principalmente em regiões tropicais e subtropicais, cuja ocorrência mostra-se menor que aquela verificada para *A. marginale*. A espécie *Rhipicephalus simus* é seu vetor comprovado, porém a

bactéria já foi detectada molecularmente em *Haemaphysalis punctata* e *Amblyomma* sp. A transmissão de *A. centrale* pode ocorrer de forma mecânica, ou biológica através da picada de determinadas espécies de carrapatos (PALOMAR et al., 2015; TESHALE et al., 2015; BATTILANI et al., 2017). *Anaplasma centrale* ocasiona uma enfermidade leve, comparada àquela produzida por *A. marginale*. Esta característica propicia a utilização deste patógeno como uma vacina viva contra a anaplasmoose bovina. Entretanto, esta prática não tem a capacidade de induzir imunidade total contra *A. marginale* nos animais vacinados. Adicionalmente, o referido ensaio de vacinação necessita de animais doadores, o que aumenta o risco de transmissão de outros hemoparasitas (KOCAN et al., 2015; BATTILANI et al., 2017).

2.2.3. *Anaplasma ovis*

Trata-se de um parasito intraeritrocítico obrigatório, causador da anaplasmoose ovina em ovelhas e cabras, assim como em ruminantes selvagens (RENNEKER et al., 2013; BATTILANI et al., 2017). Já foi detectado em renas (*Rangifer tarandus*) (HAIGH et al., 2008) e veado-europeu (*Capreolus capreolus*) (YBAÑEZ et al., 2014). Ademais, Chochlakis et al. (2010) relataram a ocorrência de infecção por *A. ovis* em um ser humano no Chipre. Este agente foi relatado principalmente em estudos realizados na Europa, EUA, Ásia e África (RENNEKER et al., 2013; BATTILANI et al., 2017). Os principais vetores biológicos de *A. ovis* são os carrapatos *Rhipicephalus bursa* e *Dermacentor andersoni*. Recentemente, este agente também foi detectado em espécimes de *R. microplus* coletados de bovinos em Moçambique (MATSIMBE et al., 2017). Embora aspectos relacionados à transmissão deste agente a seres humanos não estejam claros, deve-se considerar o potencial zoonótico de *A. ovis* (CHOCHLAKIS et al., 2010; BATTILANI et al., 2017). Os animais infectados por *A. ovis* podem apresentar uma doença branda, porém em situações de estresse ou coinfeção com outros patógenos há risco da manifestação de uma doença grave, com ocorrência de febre, fraqueza, anorexia, mucosas pálidas, diminuição da produção de leite, abortamento e até a morte (BATTILANI et al., 2017).

2.2.4. *Anaplasma bovis*

Anaplasma bovis, parasita de monócitos e macrófagos (**Figura 1C e 1D**), é comumente detectado em bovinos (*Bos taurus*) e búfalos africanos (*Syncerus caffer*) (OOSHIRO et al., 2008), mas também já foi encontrado em outros animais, tais como veados-vermelhos (*Cervus elaphus*), cervos-sika (*Cervus nippon*), veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), guaxinim (*Procyon lotor*) e cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) (SASHIKA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2012; LI et al., 2015; BATTILANI et al., 2017). O papel dos diferentes hospedeiros no ciclo biológico de *A. bovis* ainda não foi determinado (YBAÑEZ et al., 2016). Encontra-se distribuído essencialmente na África, Ásia e América do Sul, embora já tenha sido relatado no sul da Europa e nos EUA (YBAÑEZ et al., 2016; BATTILANI et al., 2017). A transmissão biológica é feita principalmente pelos carrapatos *Hyalomma* sp., *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Haemaphysalis* spp. (UILENBERG et al., 1993; DUMLER et al., 2001; GOETHERT; TELFORD, 2003; HARRUS et al., 2010; PALOMAR et al., 2015; YANG et al., 2014). Em relação à manifestação da doença, bovinos e búfalos geralmente apresentam sinais clínicos moderados, porém casos mais graves já foram relatados na literatura (BATTILANI et al., 2017), existindo ainda, risco de morte para os animais. Os principais sinais clínicos incluem febre, que pode ocorrer esporadicamente ou com duração de várias semanas, além de anemia, perda de peso, e diarreia. Alguns animais exibem inchaço na cabeça e lacrimejamento, enquanto que danos ao sistema nervoso central, embora já relatados, sejam menos comuns (SREEKUMAR et al., 1996, LIU et al., 2012; YBAÑEZ et al., 2016).

2.2.5. *Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum é uma bactéria que parasita neutrófilos de vertebrados (**Figura 1E e 1F**) (DUGAT et al., 2015; SAID et al., 2018). Atualmente é considerado um patógeno responsável por uma zoonose emergente nos Estados Unidos e Europa (KOCAN et al., 2015). Entre seus hospedeiros vertebrados

conhecidos incluem-se os seres humanos, além de ruminantes, carnívoros, roedores, aves e répteis (STUEN et al., 2013; KOCAN et al., 2015; BATTILANI et al., 2017). Encontra-se distribuído geograficamente por toda a Europa, Ásia e EUA. Também já foi detectado na África e América do Sul; ademais, sua distribuição é determinada de acordo com a densidade populacional de carrapatos vetores e possíveis hospedeiros reservatórios.

A transmissão de *A. phagocytophilum* na Europa, EUA, Ásia e Rússia envolve algumas espécies de carrapatos pertencentes ao gênero *Ixodes*. Embora este agente tenha sido detectado molecularmente em carrapatos dos gêneros *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e *Amblyomma*, a competência vetorial destas espécies de artrópodes no ciclo epidemiológico de *A. phagocytophilum* ainda necessita de estudos (BATTILANI et al., 2017). A inoculação de sangue contaminado parece ser um modo de transmissão menos comum (FINE et al., 2016). Todavia, existem relatos de transmissão deste agente para animais e humanos através da exposição a amostras de tecidos e sangue infectados (BAKKEN et al., 1996; BATTILANI et al., 2017).

Os vertebrados parasitados podem exibir leucopenia, neutropenia e redução da atividade de neutrófilos. Como consequência, o referido agente causa imunossupressão, a qual pode propiciar a ocorrência de infecções oportunistas (WOLDEHIWET, 2010; KOCAN et al., 2015). Em ruminantes, *A. phagocytophilum* causa enfermidade conhecida como Febre da Pastagem ou Febre do Carrapato (WOLDEHIWET, 2010), caracterizada principalmente por febre alta, anorexia, e redução da produção de leite. Infecções secundárias por *Staphylococcus aureus* também já foram observadas, devido ao efeito imunossupressor de *A. phagocytophilum* (WOLDEHIWET, 2006; BATTILANI et al., 2017). A anaplasmoze granulocítica equina, por sua vez, é caracterizada por febre, falta de apetite, depressão, edema distal dos membros, dificuldade de locomoção e hemorragias petequiais (FRANZÉN et al., 2005).

Pacientes humanos infectados podem apresentar desde uma doença assintomática até um quadro grave (BAKKEN; DUMLER, 2015). A anaplasmoze granulocítica humana caracteriza-se por febre, dores de cabeça, náuseas, tosse, mal-estar, mialgia, e rigidez cervical. Diarreia, vômitos e confusão mental são

menos comumente relatados. Em casos raros, alguns pacientes podem desenvolver síndrome de choque séptico ou tóxico, síndrome de desconforto respiratório agudo, ou infecções oportunistas por outros agentes, como vírus ou fungos (BAKKEN; DUMLER, 2015; BATTILANI et al., 2017).

2.2.6. *Anaplasma platys*

Anaplasma platys é um agente que infecta plaquetas de cães (**Figura 1G**), ocasionando a doença denominada trombocitopenia cíclica canina. Também foi relatada a infecção por este patógeno em gatos (LIMA et al., 2010), raposas (*Vulpes vulpes*), camelos bactrianos (*Camelus bactrianus*), veados-vermelhos (*Cervus elaphus*), cervos-sika (*Cervus nippon*), bovinos e em seres humanos (HARVEY et al., 1978; MAGGI et al., 2013; QUROLLO et al., 2014; CARDOSO et al., 2015; LI et al., 2015a; LI et al., 2015b; DAHMANI et al., 2015; BATTILANI et al., 2017). Ademais, Zobba et al. (2014), empregando ensaios de PCR para os genes 16S rRNA e *groEL*, e com auxílio das técnicas de hibridização *in situ* e microscopia confocal, detectaram genótipos de *Anaplasma* sp. filogeneticamente associados a *A. platys* em neutrófilos de caprinos na Itália. No Brasil, Sacchi et al. (2012) detectaram genótipos filogeneticamente associados a *A. platys* em cervos-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*). Em Moçambique, Machado et al. (2016) detectaram genótipos relacionados à *A. platys* em búfalos africanos (*Syncerus caffer*). O referido agente possui distribuição mundial, tendo o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) como possível vetor biológico (SIMPSON et al., 1991; INOKUMA et al., 2000; YBAÑEZ et al., 2012), o mesmo já foi detectado em *Dermacentor auratus*, *Ixodes persulcatus*, *Haemaphysalis longicornise* *Rhipicephalus turanicus* (PAROLA et al., 2003; BROWN et al., 2005; KIM et al., 2006; HARRUS et al., 2010). A doença causada por *A. platys* em cães caracteriza-se por ciclos de parasitemia e trombocitopenia, com duração entre 8 a 15 dias (HARVEY et al., 1978; BATTILANI et al., 2017). Em cães, a infecção pode manter-se assintomática ou apresentar sinais clínicos como letargia, febre, perda de peso, mucosas pálidas, hemorragias petequiais da pele e mucosas orais, e linfonodomegalia (BRADFIELD et al., 1996; BOUZOURAA et al., 2016; BATTILANI

et al., 2017). Até o momento não foram descritos sinais clínicos associados à infecção por *A. platys* em ruminantes. O referido agente já foi molecularmente detectado em seres humanos na Venezuela (ARRAGA-ALVARADO et al., 2014) e nos EUA (MAGGI et al., 2014).

2.2.7. *Anaplasma odocoilei*

Anaplasma odocoilei é um agente patogênico filogeneticamente relacionado à *A. platys*. O referido agente foi detectado em plaquetas (**Figura 1H e 1I**) de cervídeos (TATE et al., 2013). Este parasito foi isolado de amostras de sangue de cervos-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) em cultura de células embrionárias derivadas de carrapatos *I. scapularis* (ISE6) (MUNDERLOH et al., 2003). Trout et al. (2017) relataram a ocorrência de *A. odocoilei* em espécimes de *A. americanum* nos EUA, enquanto que no Brasil, genótipos filogeneticamente associados a *A. odocoilei* foram detectados em amostras de roedores (BENEVENUTE et al., 2017). Com base em características biológicas, genéticas e antigênicas únicas deste agente, o mesmo foi classificado como uma nova espécie por Tate et al. (2013). A nova proposta foi sustentada após infecção experimental de *O. virginianus* com esta nova espécie de *Anaplasma* sp. Na fase aguda da infecção experimental foram encontradas estruturas diminutas, escuras e esféricas nas plaquetas dos cervídeos. Alguns animais avaliados no estudo apresentaram trombocitopenia transitória, porém nenhum animal demonstrou sinais de doença clínica (TATE et al., 2013).

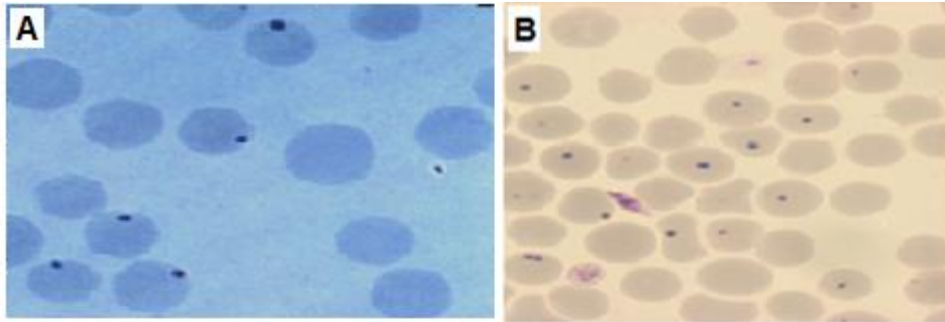
2.2.8. *Anaplasma capra*

Li et al. (2015) propuseram o nome *Anaplasma capra* para um parasita detectado molecularmente em amostras de sangue de cabras assintomáticas na China, embora as células-alvo infectadas por este agente ainda sejam desconhecidas. As análises filogenéticas baseadas nos genes 16S rRNA, *gltA*, *groEL*, *msp2*, e *msp4* sustentaram *A. capra* como uma espécie distinta das demais pertencentes ao gênero *Anaplasma*. Os autores supracitados também detectaram *A. capra* em pacientes humanos de um hospital da Província de Heilongjiang, no nordeste da

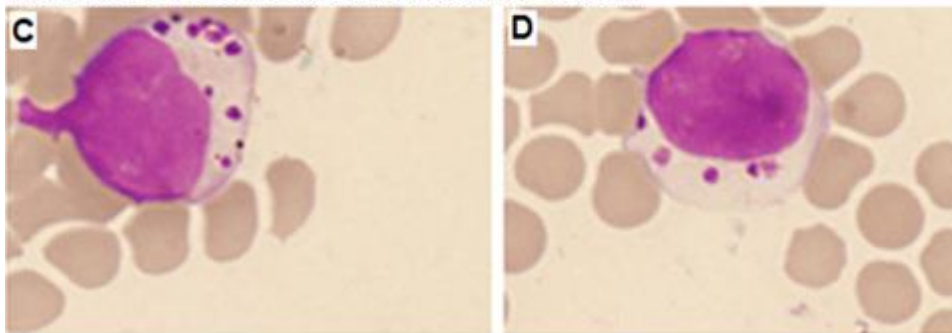
China. Recentemente, Yang et al. (2017) detectaram *A. capra* em 18,2 % (79/435) de pequenos ruminantes domésticos amostrados na China. A distribuição geográfica e carrapatos vetores envolvidos na transmissão biológica desta possível nova espécie de *Anaplasma* ainda são pouco conhecidos, embora *A. capra* tenha sido detectado em espécimes de *Ixodes persulcatus* por Li et al. (2015) na China. Seres humanos infectados por este patógeno exibiram febre, dor de cabeça, mal-estar, tonturas, mialgia e calafrios, erupção cutânea ou escara, linfadenopatia, sintomas gastrointestinais e rigidez cervical (LI et al., 2015).

2.2.9. 'Candidatus Anaplasma boleense'

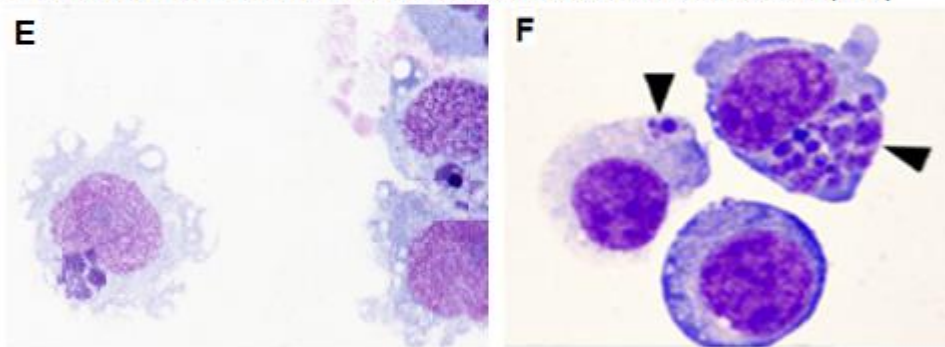
Este agente foi relatado pela primeira vez em carrapatos da espécie *Hyalomma asiaticum* na região de Bole, na China, após análises dos genes 16S rRNA, *gltA* e *groEL* (KANG et al., 2014). Até o momento, desconhecem-se as células-alvo infectadas por este parasita. Ainda na China, Guo et al. (2016) realizaram ensaios de PCR baseados nos mesmos genes que o estudo anteriormente citado, e detectaram o referido agente em mosquitos *Aedes albopictus*, *Anopheles sinensis*, *Armigeres subalbatus*, e *Culex quinquefasciatus* e propuseram uma nova espécie: 'Candidatus *A. boleense*'. Aspectos relacionados à distribuição geográfica, hospedeiros envolvidos e possível risco de infecção em humanos ainda permanecem desconhecidos.



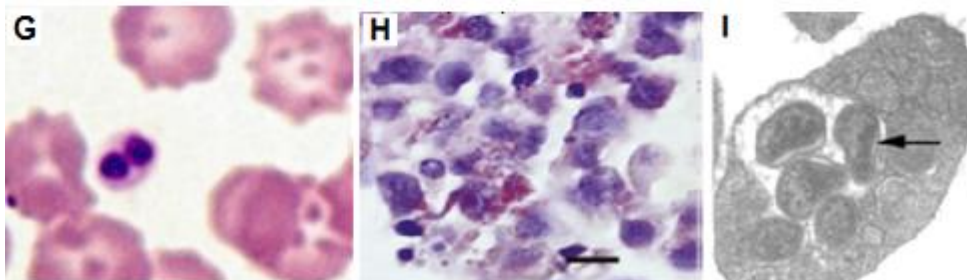
A: Eritrócitos bovinos infectados com *A. marginale*
 Fonte: Cedido por Profa. Rosângela Zacarias Machado
 B: *A. centrale* Fonte: Modificado de Bell-Sakvi et al. (2015)



C e D: Inclusões de *A. bovis* em monócitos ovinos. Modificado de Liu et al. (2012)



E: Cultura de *A. phagocytophilum* Fonte: Cedido por Profa. Rosângela Zacarias Machado
 F: Mórulas de *A. phagocytophilum* em célula ISE6 de carrapato *I. scapularis*
 Fonte: Modificado de De la Fuente et al. (2016)



G: *Anaplasma platys* Fonte: Cedido pela Profa. Rosângela Zacarias Machado
 H: Resultado de Imuno-histoquímica em cultura de células de carrapatos infectados com *A. odocoilei*. Fonte: Tate et al. (2013)
 I: Micrografia eletrônica de transmissão, mostrando plaquetas de cervo-de-cauda-branca com mórulas contendo *A. odocoilei*. Fonte: Tate et al. (2013)

Figura 1. Inclusões de espécies de *Anaplasma* em suas respectivas células-alvo.

2.3. Diagnóstico de *Anaplasma* spp.

O diagnóstico por observação direta de esfregaços sanguíneos corados, apresenta baixa sensibilidade quando os níveis de bacteremia encontram-se baixos, ou em casos de infecções persistentes. Todavia, durante a fase aguda da enfermidade, a visibilização de inclusões ou mórulas nas células-alvo torna-se facilitada (KOCAN et al., 2015; SILAGHI et al., 2017). Adicionalmente, utilizam-se testes sorológicos e moleculares no diagnóstico de infecções por *Anaplasma* spp. O diagnóstico sorológico possui praticidade ao avaliar um grande número de animais (MASSUNG; SLATER, 2003; COETZEE et al., 2007; STUEN et al., 2013).

As proteínas principais de superfície (MSP) vem sendo utilizadas em testes sorológicos e moleculares, visando maiores sensibilidade e especificidade no diagnóstico das infecções por *Anaplasma* spp. Testes de Fixação do Complemento e de Aglutinação em Cartão, outrora utilizados no diagnóstico sorológico da anaplasmoze bovina, apresentam baixa sensibilidade durante o período de incubação da enfermidade e em cursos de infecções persistentes (BRADWAY et al., 2001; COETZEE et al., 2005; KOCAN et al., 2015). Kits comerciais de Ensaio Imunoenzimático competitivo (cELISA) baseados em proteínas *mSP5* de *A. marginale*, embora apresentem alta sensibilidade, geram reações cruzadas contra outros organismos do gênero *Anaplasma*, provavelmente devido à alta conservação do gene *mSP5*, o que traz inespecificidade a estes testes (KOCAN et al., 2015).

As proteínas principais de superfície (MSP), *mSP1 α* , *mSP1 β* , *mSP2*, *mSP3*, *mSP4* e *mSP5*, são expostas na superfície externa das espécies de *Anaplasma*, interagindo com o sistema imunológico do hospedeiro e proporcionando a execução de funções que permitem a sobrevivência do parasita (ARULKANTHAN et al., 1999). As sequências de MSP são frequentemente utilizadas na análise da diversidade genética de espécies de *Anaplasma* (PALMER et al., 1999). Enquanto as proteínas *mSP1 α* , *mSP4* e *mSP5* são codificadas por um único gene, *mSP1 β* , *mSP2* e *mSP3* são codificadas por famílias multigênicas (KOCAN et al., 2003).

MSP1 é uma proteína formada pelos polipeptídeos *mSP1 α* (100 kDa) e *mSP1 β* (105 kDa), de estruturas não relacionadas e unidas de forma não covalente (BARBET; ALLRED, 1991). A região C-terminal desta proteína é conservada,

enquanto que a região N-terminal é altamente variável. Esta última contém um domínio de adesão para hemácias de bovinos e células de carrapatos, sendo fundamental para o processo de transmissão de *A. marginale* (DE LA FUENTE et al., 2005b; BATTILANI et al., 2017). Atualmente, utiliza-se *msp1a* para identificar estirpes diferentes de *A. marginale*, por meio de comparações das sequências de aminoácidos e massa molecular. A mudança no peso deve-se à variações no número de *tandem repeats*, sendo que para cada estirpe de *A. marginale* verifica-se um padrão no número e sequência dos aminoácidos (DE LA FUENTE et al., 2001; DE LA FUENTE et al., 2003). Com base nesta forma de identificação, De La Fuente et al. (2007) caracterizaram 131 estirpes de *A. marginale* em amostras provenientes de diversas áreas das Américas do Norte e do Sul, África, Ásia, Austrália e Europa. Este estudo reforça os dados sobre a heterogeneidade genética deste parasita, sugerindo coevolução e introdução de linhagens bacterianas em diferentes regiões do mundo.

As proteínas *msp2* e *msp3* mostram-se imunodominantes em *A. marginale* (VIDOTTO et al., 1994; BATTILANI et al., 2017). Enquanto *msp2* é codificada por famílias de genes polimórficos em *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis*, a mesma é codificada por um único gene em *A. phagocytophilum* (PALMER et al., 1998; SHKAP et al., 2002; BRAYTON et al., 2005; BATTILANI et al., 2017).

A proteína *msp4*, por sua vez, é codificada por um único gene e mostra-se extremamente conservada. As variações existentes em sua sequência nucleotídica são suficientes para respaldar seu uso em estudos filogeográficos (DE LA FUENTE et al., 2003).

Já *msp5* é uma proteína imunodominante codificada por um único gene, que foi identificada em *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* e *A. phagocytophilum* (DE LA FUENTE et al., 2005a). Esta proteína possui a característica de ser conservada e altamente estável em *Anaplasma* spp., cuja função é ainda desconhecida. Esta proteína vem sendo utilizada como antígeno em ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para diagnóstico da anaplasrose (KOCAN et al., 2015; BATTILANI et al., 2017).

2.4. Detecção sorológica e molecular de *Anaplasma* spp. em bovinos em Moçambique

Técnicas sorológicas já foram utilizadas anteriormente para detecção de *A. marginale* em bovinos de Moçambique. A exemplo disto, Alfredo et al. (2005), por meio do teste de cartão de aglutinação, relataram uma soroprevalência para *A. marginale* de 63%, dentre 478 bovinos no distrito de Tete. Já no estudo de Tembue et al. (2011), foi encontrada uma soroprevalência de 76,5% (619/809) pelo iELISA (com antígeno *msp5* recombinante de *A. marginale*) em bovinos amostrados no sul de Moçambique. Com relação a ensaios moleculares, Bekker et al. (2002) e Martins et al. (2010) detectaram DNA de *Anaplasma* sp., pela técnica de RLB (*Reverse Line Blot Hybridization*), em bovinos amostrados em diversas localidades na província de Maputo. Ademais, Machado et al. (2016), por meio de ensaios de PCR para os genes 16S rRNA, *groEL* e *msp5*, além de qPCR para o gene *msp1 β* , detectaram *Anaplasma* sp. filogeneticamente associados a *A. centrale*, *A. marginale*, *A. platys* e *A. phagocytophilum* em búfalos africanos na Reserva de Marromeu.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivo investigar a ocorrência e diversidade genética de *Anaplasma* spp. em bovinos amostrados em Maputo, Moçambique, utilizando técnicas sorológicas e moleculares.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar a presença e quantificar o DNA de *A. marginale* e *A. phagocytophilum* em amostras de sangue de bovinos de Moçambique, por meio de ensaios de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) baseadas nos genes *msp1 β* e *msp2*, respectivamente;

- Caracterizar molecularmente *Anaplasma* spp. em amostras de sangue de bovinos por meio de ensaios de PCR convencional (cPCR) baseados em diferentes fragmentos gênicos (16S rRNA, *msh4*, *msh5*, *groEL*);
- Realizar inferências filogenéticas das sequências obtidas, posicionando-as, dentro de um parentesco evolutivo, com espécies e genótipos de *Anaplasma* spp. previamente detectadas em diferentes localidades do mundo;
- Investigar a diversidade de haplótipos de *A. marginale* com base em sequências dos genes *msh4* e *msh5*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Colheita das amostras e Área de estudo.

As amostras de soro e sangue de bovinos utilizadas no presente estudo (**Tabela 1**) foram gentilmente cedidas pelo Centro de Pesquisa “Direção de Ciências Animais de Maputo, Moçambique”. No período de junho e julho de 2014, foram colhidas 219 amostras de sangue e soro de bovinos de leite (Jersey e Holandês) mantidos em sistema de criação semi-intensivo, e de corte (Nguni e cruzamentos de Nguni) em sistema extensivo, pertencentes à cinco distritos de Maputo, Moçambique (Boane, Magude, Matutuíne, Moamba e Namaacha) (**Figura 2**). Foram colhidos de 2 a 5 mL de sangue da veia jugular ou caudal em tubos com anticoagulante EDTA sódico, para extração de DNA e posterior realização de PCR. Adicionalmente, o mesmo volume de sangue foi colhido em tubos sem anticoagulante e transferido para papel filtro Whatman®, para a realização do Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA).

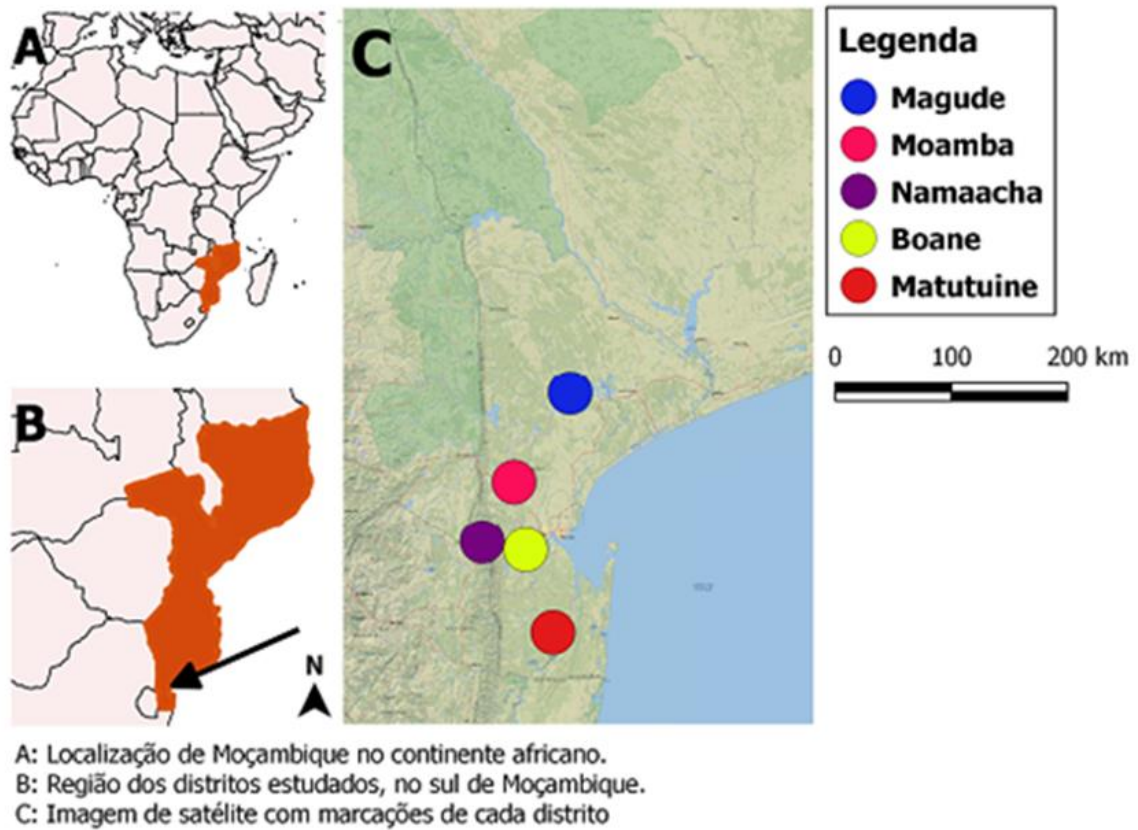


Figura 2. Mapa com a localização de Moçambique no continente africano, e área dos locais de colheita de sangue e soro de bovinos em distritos de Maputo.

4.1.1. Fisiogeografia das áreas de estudo

4.1.2. Boane

Localizado na região sudeste da província de Maputo, este distrito apresenta um clima tropical subúmido, A temperatura média anual é em torno de 23,7 °C enquanto o índice pluviométrico médio anual é de 752 mm. Esta localidade possui predisposição à ocorrência de fenômenos naturais como: ciclones, depressões, secas e cheias. Ademais, o distrito possui sérios problemas em relação ao desmatamento e erosão dos solos. A criação de gado é uma tradição nesta localidade, especialmente ligada à pecuária familiar. Na fauna bravia de Boane encontram-se animais como antílopes, macacos, cobras, hipopótamos, dentre outros (www.portaldogoverno.gov.mz/por/content/download/2965/23877/version/.../Boane.pdf).

4.1.3. Magude

Distrito localizado na região norte de Maputo, possui clima subtropical seco com temperatura média anual entre 22°C - 24°C e índice pluviométrico médio anual de 630 mm. Em relação ao relevo, há predomínio de áreas planas, com solos argilosos vermelhos de alta fertilidade. Neste distrito há produção de bovinos no setor familiar e privado, além de suínos, caprinos, ovinos e aves no setor familiar. A fauna bravia de Magude possui grande diversidade de espécies, como leões e leopardos, elefantes, rinocerontes e crocodilos. Entre as espécies de pequeno porte destacam-se antílopes, javalis e macacos (www.portaldogoverno.gov.mz/por/content/download/2963/23867/.../1/.../Magude.pdf).

4.1.4. Matutuíne

Localizada no extremo Sul de Maputo, apresenta clima subtropical com duas estações principais ao longo do ano: a chuvosa de outubro a abril, e a seca, de maio a setembro. Enquanto a temperatura média anual ultrapassa 24°C, os valores de média anual de precipitação variam entre 600 mm no interior do distrito, e 1000

mm na orla costeira. A vegetação varia de acordo com o tipo de solo e a presença de cursos de água e lagoas. Deste modo, apresenta florestas densas e brenhas, florestas abertas, savanas arbóreas e graminhais. Neste distrito encontra-se a Reserva Especial do Maputo com 70.000 hectares e uma ampla diversidade de animais([www.portaldogoverno.gov.mz/por/content/download/2964/23872/.../Matutui ne.pdf](http://www.portaldogoverno.gov.mz/por/content/download/2964/23872/.../Matutui%20ne.pdf)), como elefantes, ruminantes artiodáctilos, pangolim, esquilo vermelho, crocodilos do Nilo, além de diversas espécies de aves e peixes (<http://www.portaldogoverno.gov.mz/por/Cidadao/Informacao/Turismo/Areas-de-Conservacao/Reserva-Especial-de-Maputo>).

4.1.5. Moamba

Situado na região Norte da província de Maputo, este distrito apresenta clima seco de estepe, temperatura média anual entre 23 e 24°C, com índice pluviométrico entre 580 a 590 mm. Possui planícies extensas e os solos mais comuns são os vermelhos, os pedocálicos, os pardos, hidromórficos e aluvionares. O referido distrito está situado na região Sudano-Zambeziaca entre savanas e florestas sul-africanas. Suas principais formações vegetais são florestas de baixa altitude, floresta arbustiva e matagais. Moamba é o segundo maior distrito criador de gado de Maputo. Entre os animais presentes em sua fauna destacam-se leões, elefantes, gazelas, coelhos, aves e répteis (www.portaldogoverno.gov.mz/por/content/download/2962/23862/.../1/.../Moamba.pdf).

4.1.6. Namaacha

Localiza-se a sudoeste da província de Maputo, com clima tropical úmido modificando-se de acordo com a altitude, sendo que a Norte e Leste o clima característico é seco de estepe. Há ainda predomínio de estações quentes e de alta pluviosidade. A média anual de temperatura é de 21°C, enquanto que a precipitação é de 751.1 mm. O distrito é formado por terras altas (Complexo Da Cadeia dos Libombos), planaltos médios, encostas e pequenas planícies. Esta localidade possui grande potencial para o desenvolvimento da pecuária, pela abundância de água e

boas pastagens, entretanto a produção é prejudicada por doenças nos animais e falta de recursos financeiros. Em relação à fauna bravia, é composta por antílopes, coelhos, galinhas-do-mato, macacos, cabritos do mato, jiboia e crocodilos (www.portaldogoverno.gov.mz/por/content/download/2968/23892/.../Namaacha.pdf).

Tabela 1. Locais de colheita, raça dos animais amostrados e realização de controle de carrapatos por distritos de Maputo, Moçambique.

Distrito	Localidade	Coordenadas geográficas	Gado de Leite	Gado de Corte	Raças	Controle de carrapatos
Boane	Umbeluzi	26° 01' 39,8" S 32° 23' 18" E	25	22	Jersey e cruzamentos de Nguni	Banho carracida quinzenal
Magude	Estação Zootécnica de Chobela	25° 00' 14,2" S 32° 43' 58,1" E	25	25	Holandês e cruzamentos de Nguni	Banho carracida quinzenal
Matutuíne	Catuane	32° 06' 42,8" E 26° 40' 40,4" S	0	50	Nguni	Banho carracida irregular
Moamba	Josina Machel	25° 35' 54" S 32° 12' 61" E	0	40	Nguni	Banho carracida irregular
Namaacha	Matsequenha	25° 50' 04" S 32° 06' 42,8" E	0	32	Nguni	Controle irregular

4.2. Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA)

Para a detecção de anticorpos da classe IgG anti- *A. marginale* empregou-se a técnica de ELISA indireto (iELISA), segundo protocolo estabelecido por Machado et al. (1997) para *B. bovis* e adaptado para *A. marginale* por Andrade et al. (2004). O antígeno total de *Anaplasma marginale* utilizado foi produzido no Laboratório de Imunoparasitologia da FCAV/UNESP Jaboticabal, em uma concentração de 10µg/mL, diluído em tampão carbonato bicarbonato (0,05M, pH 9,6). Após incubação por 12 horas à 4° C, realizou-se o bloqueio com PBS Tween 20 (fosfato salina, pH 7,2 e Tween20 a 5%), adicionado de 6% de leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé, Brasil). As placas foram incubadas por 90 minutos à 37°C, em

câmara úmida. Após três lavagens com tampão PBS-Tween 20, adicionaram-se à placa de ELISA soros de referência positiva, negativa e soros-testes, os quais foram diluídos 1:400 em solução PBS-Tween 20 acrescida de 5% de soro normal de coelho. Novamente as placas foram incubadas a 37°C por 90 minutos, após três lavagens com tampão PBS-Tween 20 adicionou-se à placa de ELISA o conjugado anti-IgG de bovino ligado à fosfatase alcalina na diluição de 1:30000 em PBS-Tween 20 acrescida de 5% de soro normal de coelho, com posterior incubação e lavagem. Por fim, adicionou-se o substrato da enzima fosfatase alcalina, p-nitrofenil fosfato (Sigma, St. Louis, MO), diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina (pH 9,8) (Sigma, St. Louis, MO). As placas foram seladas com papel alumínio e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (B.T. - 100; Embrabio, São Paulo, Brasil), com filtro de 405nm. O ponto de corte foi calculado como 2,5 vezes a absorbância média dos soros controle-negativos (MACHADO et al, 1997).

4.3. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue dos bovinos amostrados foi realizada no Centro de Pesquisa “Direção de Ciências Animais de Maputo, Moçambique” pelo Dr. Carlos Matos. O DNA foi extraído a partir de 200 µL de sangue de cada amostra, utilizando-se o QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Madison, Estados Unidos), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras tiveram sua concentração de DNA e relações 260/280 mensuradas em aparelho espectrofotômetro NanoDrop (ThermoScientific, San Jose, CA, Estados Unidos). Posteriormente foram armazenadas a -20 °C para realização dos ensaios dePCR.

4.4. Reação de Amplificação para o gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

A fim de confirmar a qualidade e verificar a presença de inibidores nas amostras de DNA, foi realizada uma reação de PCR para o fragmento do gene gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH) de mamíferos, conforme descrito anteriormente por Birkenheuer et al. (2003). Para tal, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores GAPDH-F (5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e GAPDH-R (5'- CCAAAGTTGTTCATGGATGACC-3'). A reação de amplificação foi realizada utilizando-se um volume total final de 25 µL, com uma mistura contendo 5µL do DNA-amostra, 0,2 µM de cada deoxinucleotídeo, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,0 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen®, Carlsbad, California, Estados Unidos), tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. A sequência térmica e o tempo de amplificação foram aplicados com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos (BIRKENHEUER et al., 2003).

4.5. PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para *A. marginale* (gene *msp1β*) e *A. phagocytophilum* (gene *msp2*)

As amostras positivas na PCR baseada no gene GAPDH foram submetidas a ensaios de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para *A. marginale* (CARELLI et al., 2007), com modificações para o gene *msp1β*, e para *A. phagocytophilum* baseada no gene *msp2* (DRAZENOVICH et al., 2006). Todas as amostras foram testadas em duplicatas com volume total final de 10 µL. A mistura continha 1 µL do DNA-amostra, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e sonda de hidrólise (**Tabela 2**), 5 µL de tampão da PCR (GoTaq Probe qPCR Master Mix, Promega®, Madison, Wisconsin, EUA) e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 10µL. As reações de amplificação foram conduzidas em placas Multiplate low-profile (BioRad™, Hercules,

California, USA), em aparelho termociclador CFX96 Thermal Cycler (BioRad®, Hercules, Califórnia, Estados Unidos). As sequências térmicas utilizadas para cada reação estão descritas na **Tabela 2**. Diluições seriadas foram feitas com o intuito de construir 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). O número de cópias de plasmídeos foi determinado de acordo com a fórmula: $(\text{Xg}/\mu\text{L DNA} / [\text{tamanho do plasmídeo (pb)} \times 660]) \times 6,022 \times 10^{23}$ x cópias do plasmídeo/ μL).

Tabela 2. Descrição dos ensaios de qPCR para *Anaplasma marginale* e *Anaplasma phagocytophilum* baseados nos genes *msp1 β* e *msp2*, respectivamente, utilizados no presente estudo.

Agente, gene-alvo e tamanho do amplicono (pb)	Sequência do oligonucleotídeo	Sondas de hidrólise	Sequência térmica	Referência
<i>A. marginale</i> (<i>msp1β</i>) 95 pb	AM-F (5'-TTGGCAAGGCAGCAGCTT-3') e AM-R (5'-TTCCGCGAGCATGTTGCAT-3')	AM-sonda: 6FAM-5' TCGGTCTAACATCTCCAGGCTTTCAT-3'-BHQ1	2 minutos a 50° C, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.	CARELLI et al., 2007
<i>A. phagocytophilum</i> (<i>msp2</i>) 122 pb	903f (5'-AGTTTGACTGGAACACACCTGATC-3') 1024r (5'-CTCGTAACCAATCTCAAGCTCAAC-3')	5' [FAM] (939p-TTAAGGACAACATGCTTGTAGCTATGGAAG-GCA) [TAMRA] 3'	50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.	DRAZENOVICH et al., 2006

4.6. Ensaios de PCR convencional (cPCR) para *Anaplasma* spp. baseados nos genes 16S rRNA, *msp4*, *msp5*, e *groEL*

Inicialmente, todas as 219 amostras foram submetidas à cPCR baseada no gene 16S rRNA (MASSUNG et al., 1998). Dentre as amostras positivas para esta reação, foram selecionadas 10 representantes de cada localidade abordada no presente estudo, totalizando 50 amostras. Posteriormente, as amostras selecionadas foram submetidas a ensaios de cPCR adicionais baseados: no gene *msp4*, a fim de detectar *Anaplasma marginale*, *A. centrale* e *A. ovis* utilizando protocolo previamente descrito por De La Fuente (2004); no gene *msp5* para *A. marginale*, conforme descrita por Echaide et al. (1998) e Singh et al. (2012); no gene 16S rRNA para *Anaplasma* spp. (ZOBBA et al., 2014); e no gene *groEL* de *A. phagocytophilum*/*A. platys*, conforme descrita por Summer et al. (1997), Lotric-Furlan et al. (1998) e Nicholson et al. (1999). As condições de ciclagem e oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de cPCR acima mencionadas estão descritos na **Tabela 3**. Água Ultrapura (Promega®) foi utilizada como controle negativo para todas as reações. DNA controle-positivo de *Anaplasma phagocytophilum* foi gentilmente cedido pelo Prof. John Stephen Dumler (Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD, USA). DNA controle positivo de *A. marginale* foi obtido de búfalos africanos naturalmente infectados (MACHADO et al., 2016).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo, em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 44 M ácido bórico; 12,49mM EDTA). Para as visualizações dos resultados foram utilizados marcador de peso molecular de 100 pares de base (Thermo Scientific, Sam Jose, CA, Estados Unidos) e transiluminador acoplado a um programa computacional de análise de imagens (ChemiDoc Imaging System, BioRad®).

Tabela 3. Descrição das sequências de oligonucleotídeos iniciadores e condições de ciclagem utilizados nos ensaios de PCR convencional para *Anaplasma* spp.

Gene-alvo e tamanho do amplicon (pb)	Agentes	Sequência de Oligonucleotídeos (5'-3')	Condições de ciclagem	Referências
(gene 16S rRNA) 1ª reação 932 pb 2ª reação 546 pb	<i>A. phagocytophilum</i> <i>A. bovis</i> <i>A. platys</i>	gE3a: (CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC) gE10R: (TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC) gE2: (GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG) gE9f: (AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT)	95°C por 2 minutos, 40 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C. Extensão de 72°C por 5 minutos. Na segunda reação quantidade de ciclos: 30	(MASSUNG et al., 1998)
(gene msp4) 842 pb	<i>A. marginale</i> <i>A. centrale</i> , <i>A. ovis</i>	MSP45:(GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC) MSP43:(CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGCT)	94°C por 30 segundos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final a 72°C por 5 minutos.	(DE LA FUENTE et al., 2004)
(gene msp5) 458 pb	<i>A. marginale</i>	Amar msp5 eF: (GCA TAG CCT CCG CGT CTT TC) Amar msp5 eR: (TCC TCG CCT TGG CCC TCA GA) Amar msp5 iF: (TAC ACG TGC CCT ACC GAG TTA)	94°C por 5 minutos, 34 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final de 72°C por 10 minutos.	(ECHAIDE et al., 1998; SINGH et al., 2012)
(gene 16S rRNA) ~800 pb	<i>Anaplasma</i> spp.	AnaplsppF: (AGAAGAAGTCCCGGCAAAC) AnapIR3: (GAGACGACTTTTACGGATTAGCTC)	94°C por 3 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final de 72°C por 10 minutos.	(ZOBBA et al., 2013)
(operon groEL) 1ª reação 1300 - 1450bp 2ª reação 1297 pb	<i>A. phagocytophilum</i> <i>A. platys</i>	HS1a: AITGGGCTGGTAITGAAAT HS6a: CCICCIIGGIACIAIACCTTC HS43: AT(A/T)GC(A/T)AA(G/A)GAAGCATAGTC HSVR: CTCAACAGCAGCTCTAGTAGC	3 ciclos iniciais de 94°C por 1 minuto, 48°C por 2 minutos, 72°C por 90 segundos. 37 ciclos de 94°C por 1 minuto, 48°C por 2 minutos, 72°C por 90 segundos, seguidos de 72°C por 5 minutos. Na segunda reação, temperatura de anelamento: 55°C.	(SUMNER et al., 1997; LOTRIC-FURLAN et al., 1998; NICHOLSON et al., 1999)

4.7. Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados

Os produtos amplificados foram purificados com Sílica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, San Jose, CA, Estados Unidos), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA purificado foi realizada em aparelho espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Posteriormente o sequenciamento foi realizado de acordo com o método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977) em sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystem, 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).

4.8. Análise filogenética

Os eletroferogramas gerados após o sequenciamento foram avaliados observando-se a qualidade dos picos correspondentes a cada base sequenciada, por meio dos programas FinchTV 1.4.0. e *Phred/Phrap/Consed* (GORDON et al., 1998; EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998). As sequências consenso foram obtidas utilizando o programa CAP3 (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/MobyliPortal/portal.py>). Ademais, os programas Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999) e BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), foram utilizados para comparação das sequências obtidas com outras previamente depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Para o alinhamento das sequências salvas em modo “FASTA” foram empregados os softwares Clustal/W (THOMPSON et al., 1994) através dos programas Bioedit na versão 7.0.5.3 (HALL, 1999) e MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*) (KATO et al., 2002). Para a conversão do arquivo de alinhamento em formato Nexus, utilizou-se o site *Alignment Transformation Environment* (GLEZ-PEÑA et al., 2010). As matrizes de identidade para as

sequências dos genes *msp4* e *msp5* foram geradas no programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999).

O sinal filogenético dos diferentes fragmentos gênicos (16S rRNA, *msp4*, *msp5*, e *groEL*) utilizados na inferências filogenéticas foi aferido utilizando o pacote de programas TREE-PUZZLE (versão 5.3.rc16) (SCHMIDT et al., 2002).

O modelo evolutivo “*Best of It*” para cada matriz de dados gerada após os alinhamentos foi encontrado utilizando o software jModelTest 2 (DARRIBA et al., 2012; GUINDON; GASCUEL, 2003), via portal CIPRES (MILLER et al., 2010). As análises de Máxima Verossimilhança (MV) foram realizadas pela plataforma IQ-TREE web server (TRIFINOPOULOS et al., 2016), enquanto índices de suportes dos clados foram avaliados através de análises de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) de 1000 repetições. Já as análises Bayesianas (BI) foram conduzidas no software MrBayes 3.2.2 on XSEDE (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) através do portal CIPRES (MILLER et al., 2010) com 10^8 gerações, cujos números de classes de substituição variaram conforme o modelo evolutivo encontrado para cada conjunto de dados. A edição das árvores filogenéticas foi realizada utilizando o software Treegraph 2.0.56-381 beta (STOVER; MULLER, 2010).

4.9. Diversidade de haplótipos de *Anaplasma marginale*

Os alinhamentos das sequências dos genes *msp4* e *msp5* de *Anaplasma marginale* foram utilizados para calcular a diversidade de nucleotídeos (Pi), nível de polimorfismos (diversidade de haplótipos [hd], número de haplótipos [h] e a média de diferenças nucleotídicas [k]), utilizando o software DnaSP v6 (LIBRADO e ROZAS, 2009).

5.0. RESULTADOS

5.1. Detecção de anticorpos IgG anti-*A. marginale* (iELISA)

No teste iELISA para detecção de anticorpos IgG anti- *A. marginale*, 86,3%

(189/219) das amostras mostraram-se positivas, com valores de absorvância maiores ou iguais ao ponto de corte de 0.249 nm.

Tabela 4. Soroprevalência para *Anaplasma marginale* em bovinos amostrados em cinco distritos na cidade de Maputo, Moçambique.

Distrito	Localidade	Soroprevalência
Boane	Umbeluzi	95,7% (45/47)
Magude	Estação Zootécnica de Chobela	94% (47/50)
Matutuíne	Catuane	88% (44/50)
Moamba	Josina Machel	65% (26/40)
Namaacha	Matsequenha	84,4% (27/32)

5.2. Ensaios de qPCR para *A. marginale* (gene *msp1 β*) e *A. phagocytophilum* (gene *msp2*).

Todas as 219 amostras utilizadas no estudo mostraram-se positivas na PCR para o gene endógeno GAPDH. Seis amostras (2,74%) mostraram-se positivas na qPCR para *A. phagocytophilum* baseada no gene *msp-2*, com média de Cq de 34,0 e desvio padrão de 9,92. Já na qPCR direcionada ao gene *msp1 β* para *A. marginale*, 97,3% (213/219) mostraram-se positivas, com média de Cq de 26,45 e desvio-padrão de 5,14. Os parâmetros dos ensaios de qPCR (eficiência, slope, coeficiente de determinação e y-intercepto), estão representados na **Tabela 5**. Comparando os resultados de qPCR e sorologia para *A. marginale*, seis amostras (2,74%) mostraram-se negativas na qPCR e soropositivas para o referido agente no iELISA. Trinta amostras (13,7%) mostraram-se soronegativas para *A. marginale* e positivas na qPCR para o agente sob estudo.

Tabela 5. Parâmetros dos ensaios de qPCR para *Anaplasma marginale* (*msp1β*) e *Anaplasma phagocytophilum* (*msp2*).

	E	R ²	Slope	Y- intercepto	Cq	SQ
<i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>)						
Média	101,4	0,992	-3,290	38,588	26,45	1,627 x 10 ⁴
Máximo	105,0	0,999	-3,208	40,297	38,49	1,845 x 10 ⁵
Mínimo	94,0	0,977	-3,475	38,015	21,26	7,118 x 10 ⁻¹
<i>A. phagocytophilum</i> (gene <i>msp2</i>)						
Média	91,1	0,970	-3,419	42,507	34,0	9,531 x 10 ⁴
Máximo	92,7	0,998	-3,011	44,467	45,69	3,749 x 10 ⁵
Mínimo	90,0	0,904	-3,587	40,506	22,47	1,969 x 10 ⁻¹

E: Eficiência de amplificação; R²: coeficiente de determinação; Slope; Cq: Ciclo de quantificação; SQ: (Starting Quantity – Quantidade de DNA inicial).

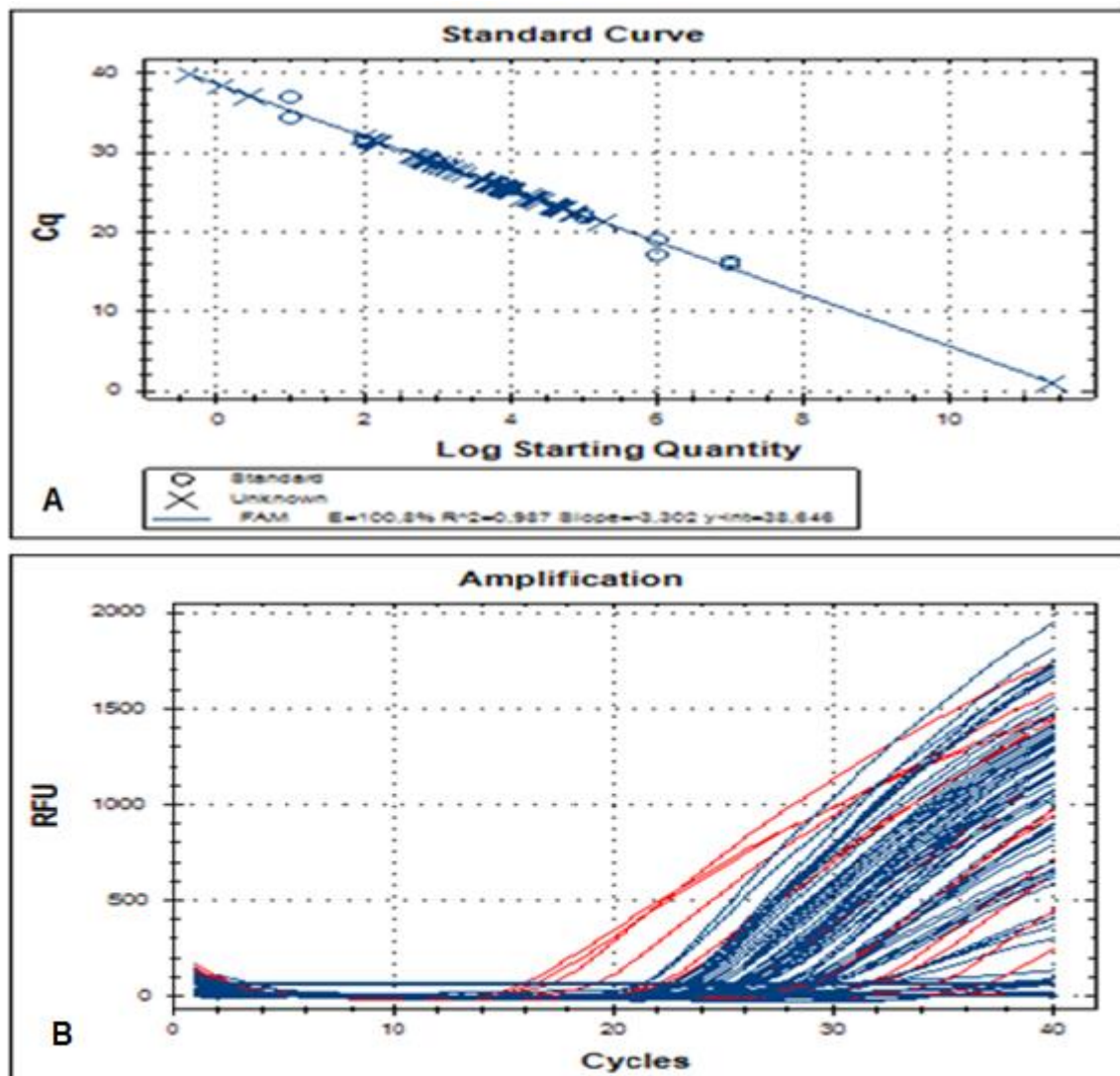


Figura 3. Curva-padrão **(A)** e Curvas de amplificação **(B)** da qPCR para *A. marginale* baseada no gene *msp1 β* . A figura **(A)** representa a curva-padrão do número de ciclos (Cq) versus as diluições seriadas dos padrões com diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo a sequência-alvo de 95 pb de *msp1 β* de *A. marginale* ($2,0 \times 10^7$ cópias/ μ L a $2,0 \times 10^0$ cópias/ μ L). A figura **(B)** apresenta os ciclos de amplificação das amostras-teste (em azul) e da diluição seriada de um plasmídeo contendo a sequência-alvo de *A. marginale* (em vermelho).

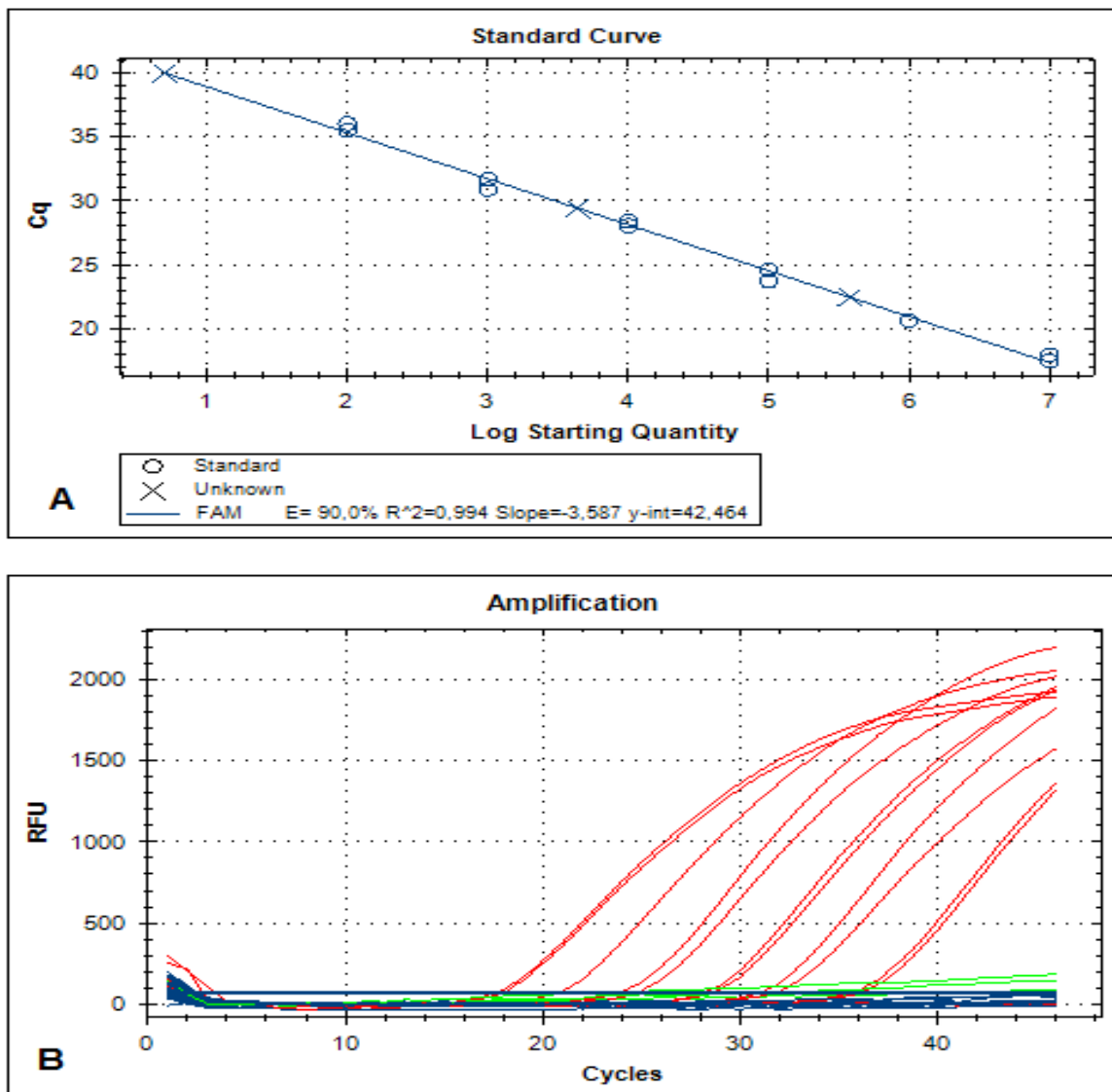


Figura 4. Curva-padrão **(A)** e Curvas de amplificação **(B)** da qPCR para *A. phagocytophilum* baseada no gene *msp2*. A figura **(A)** representa a curva-padrão do número de ciclos (Cq) versus as diluições seriadas dos padrões com diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo a sequência-alvo de 122 pb de *msp2* de *A. phagocytophilum* ($2,0 \times 10^7$ cópias/ μL a $2,0 \times 10^0$ cópias/ μL). A figura **(B)** apresenta os ciclos de amplificação das amostras-teste (em azul, amostras negativas; em verde amostras positivas) e da diluição seriada de um plasmídeo contendo a sequência-alvo de *A. marginale* (em vermelho).

5.3. Ensaio de cPCR e inferência filogenética para *Anaplasma* spp. baseados em um fragmento do gene 16S rRNA (protocolo de Massung et al., 1998).

Cento e noventa e uma (87,2%) dentre as duzentas e dezenove amostras avaliadas, mostraram-se positivas na nested PCR para *Anaplasma* spp. baseada em um fragmento do gene 16S rRNA (protocolo de Massung et al., 1998). Na **Tabela 6** encontram-se os resultados da análise pelo BLAST das 50 amostras sequenciadas, com suas respectivas porcentagens de identidade e agentes relacionados.

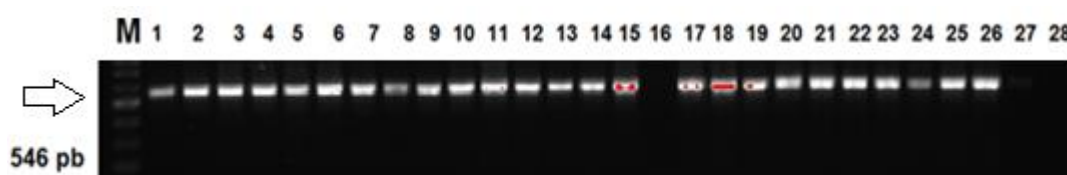


Figura 5. Resultados parciais da eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando os amplímeros relativos à PCR para *Anaplasma* sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores gE2 e gE9f. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaletas 2 a 15, e 17 a 27: amostras positivas; Canaleta 16: amostra negativa; Canaleta 1: controle positivo (*A. phagocytophilum*), Canaleta 28: controle negativo (água esterilizada ultrapura).

Tabela 6. Porcentagens de identidade (BLAST) das sequências do gene 16S rRNA de *Anaplasma* spp. obtidas pelo protocolo de Massung et al. (1998).

Amostras	Total	Identidade (%)	Máxima identidade obtida pelo BLAST e números de acesso no GenBank
MH169137, MH169138, MH169139, MH169140, MH169141, MH169144, MH169147, MH169148, MH169149, MH169150, MH169151, MH169153, MH169154, MH169157, MH169158, MH169159, MH169160, MH169161, MH169162, MH169163, MH169164, MH169166, MH169167, MH169169, MH169170, MH169175, MH169176, MH169177, MH169178, MH169179, MH169180, MH169181, MH169182, MH169183, MH169185, MH169186.	36	99-100	<i>A. platys</i> . MG050139.1, KU586031.1 KX792089.2, KC989957.1 KU585962.1
MH169146, MH169152, MH169165, MH169168, MH169171, MH169172, MH169173, MH169184	8	99 - 100	<i>Anaplasma</i> sp. KY924884.1, KY924886.1 KF020570.1, KF020572.1 KF020578.1, JF952891.1
MH169142, MH169143, MH169145, MH169155, MH169174	5	99	<i>A. phagocytophilum</i> KC455364.1, KC455366.1 KC455363.1
MH169156	1	100	' <i>Candidatus A. boleense</i> ' KU586169.1

Três das seis amostras positivas na qPCR para *A. phagocytophilum* também mostraram-se positivas para *Anaplasma* sp. segundo protocolo de cPCR de Massung et al. (1998). Após o sequenciamento e análise pelo BLAST, tais amostras apresentaram 100% de identidade para *A. platys*.

O sinal filogenético aferido pelo software TreePuzzle foi de 84,9% (**Tabela 7**). As árvores construídas pelos métodos MV (**Figura 6**) e BI (**Figura 7**) apresentaram topologias divergentes. Na análise de MV, vinte e quatro sequências alocaram-se na porção superior da árvore em um clado próximo a *Anaplasma* sp. detectado em búfalos de Moçambique. Treze sequências alocaram-se junto a *A. platys*, enquanto onze distribuíram-se próximas a clados ocupados por *A. bovis*, *Anaplasma* sp., e *A. phagocytophilum*. Já na árvore gerada pelo método BI, a maioria das sequências geradas neste estudo alocaram-se em um clado ocupado por sequências de *A. platys* detectadas anteriormente no Brasil e na Malásia. A sequência MH169152 agrupou-se em um clado ocupado por *A. bovis*, enquanto MH169180 manteve-se isolada das demais, entre sequências de *A. odocoilei* e *Anaplasma* sp. detectada em

búfalos de Moçambique. Por fim, e apresentando posicionamento concordante entre as árvores de MV e BI com alto índice de suporte e clados, as sequências MH169156 alocaram-se juntamente ao clado de '*Candidatus Anaplasma boleense*', concordando com o resultado obtido em análise pelo BLAST. A sequência MH169173 manteve-se isolada das demais e foi posicionada próxima às sequências do grupo externo.

Tabela7. Valores de sinal filogenético para os diferentes genes utilizados no estudo inferidos pelo software TreePuzzle.

Fragmentos gênicos	QUARTET STATISTICS			
	Analysed quartets	Fully resolved quartets	Partly resolved quartets	Unresolved quartets
(gene 16S rRNA) (MASSUNG et al., 1998)	1663740	1411695 (84.9%)	94784 (5.7%)	157261 (9.5%)
(gene msp4) (DE LA FUENTE et al., 2004)	73815	54580 (73.9%)	4283 (5.8%)	14952 (20.3%)
(gene msp5) (ECHAIDE et al., 1998; SINGH et al., 2012)	194580	161487 (83.0%)	14984 (7.7%)	18109 (9.3%)
(gene 16S rRNA) (ZOBBA et al., 2013)	91390	68320 (74.8%)	15008 (16.4%)	8062 (8.8%)
(gene groEL) (SUMNER et al.,1997; LOTRIC-FURLAN et al.,1998;	8855	7918 (89.4%)	835 (9.4%)	102 (1.2%)



Figura 6. Posição filogenética das sequências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene 16SrRNA. A árvore foi construída utilizando o método de análise de MV empregando o modelo evolutivo GTR+F+G4. Os números na árvore indicam valores de bootstrap para os pontos de ramificação. As sequências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Sequências de *Ehrlichia* sp. foram utilizadas como grupo externo.

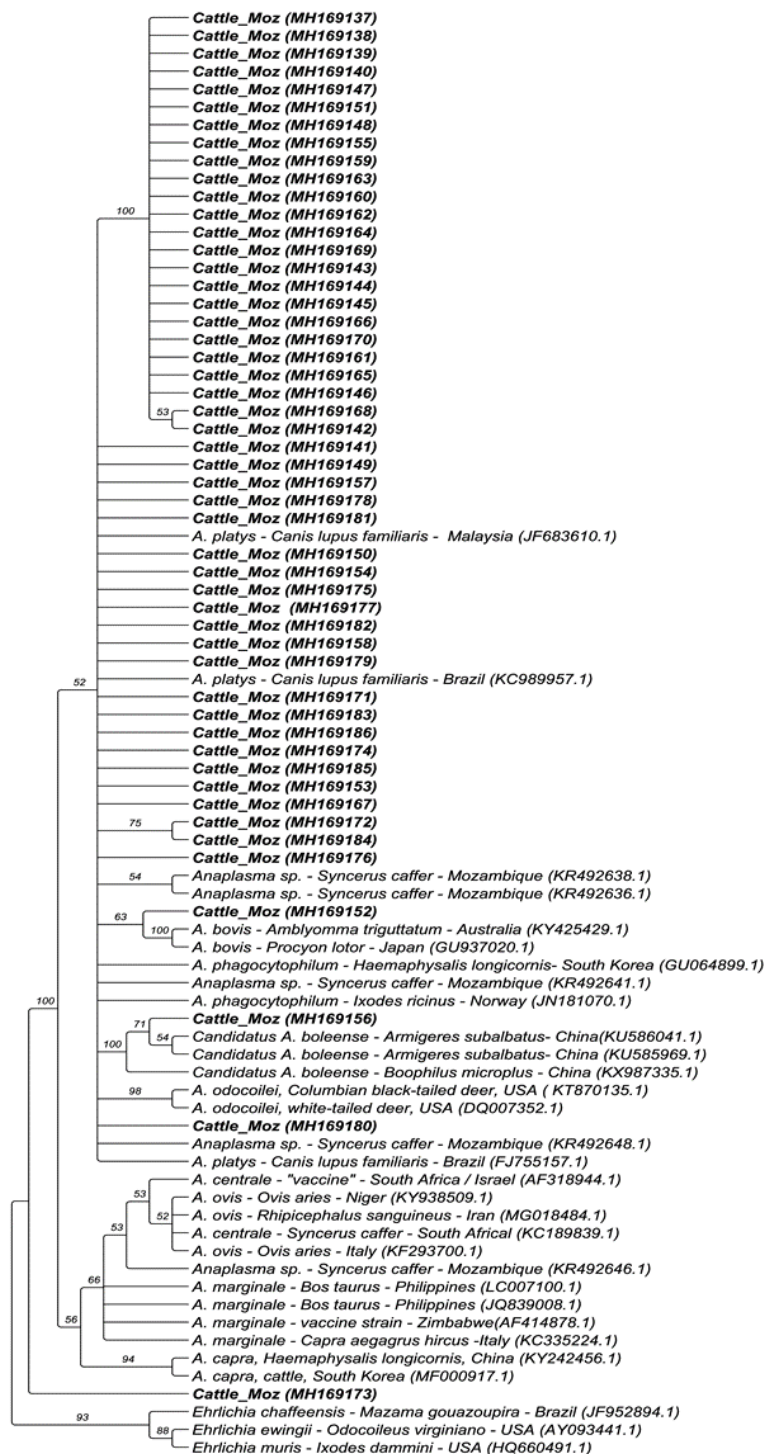


Figura 7. Posição filogenética das sequências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene 16SrRNA. A árvore foi construída utilizando o método de análise BI empregando o modelo evolutivo GTR+F+G4. Os números na árvore indicam valores de probabilidade posterior para os pontos de ramificação. As sequências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Sequências de *Ehrlichia* sp. foram utilizadas como grupo externo.

5.4. Ensaio de cPCR e inferência filogenética para *Anaplasma* spp. baseados em fragmento do gene 16S rRNA (protocolo de Zobba et al., 2014).

Ainda, 100% (50/50) das amostras selecionadas mostraram-se positivas na cPCR para *Anaplasma* spp. direcionada ao gene 16S rRNA, segundo protocolo de Zobba et al., 2014.

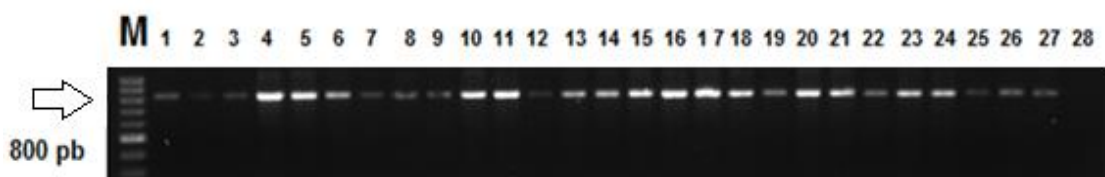


Figura 8. Resultados parciais da eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, mostrando os amplicómeros relativos à PCR para *Anaplasma* sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores Anap1sppF e Anap1R3. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaletas 2 a 27 amostras positivas; Canaleta 1: controle positivo (*A. phagocytophilum*), Canaleta 28: controle negativo (água esterilizada ultrapura).

Entre os dez amplicons encaminhados para sequenciamento, nove apresentaram melhor qualidade de sequenciamento e foram utilizados na construção de árvores filogenéticas pelos métodos de MV (**Figura 9**) e BI (**Figura 10**). Uma sequência (MH165337) mostrou 100% de identidade para *Anaplasma* sp. detectado em búfalo na África do Sul. Quatro sequências (MH165330, MH165331, MH165334, MH165335) mostraram 100% de identidade para *A. marginale*, e duas sequências (MH165329, MH165333) apresentaram 100% de identidade para *A. centrale*. Outras duas sequências (MH165332 e MH165336) mostraram, respectivamente, 100% de identidade para *A. platys* e *A. ovis*.

O sinal filogenético aferido pelo software TreePuzzle foi de 74.8% (**Tabela 7**). Na análise filogenética pelo método de MV, as sequências foram posicionadas nos clados correspondentes a *A. ovis* (sequências da Nigéria, Irã e Itália), *A. marginale* (sequências da Itália, Filipinas e Zimbábue), *A. platys* (sequência de Cuba) e *Anaplasma* sp. (sequências obtidas de búfalos africanos em Moçambique). Por outro lado, na análise pelo método de BI, a maioria das sequências foram posicionadas

próximas a uma sequência de *A.marginale* detectada em ruminantes da Itália, enquanto uma única sequência alocou-se isolada das demais, juntamente ao clado de 'Candidatus Anaplasma boleense'.

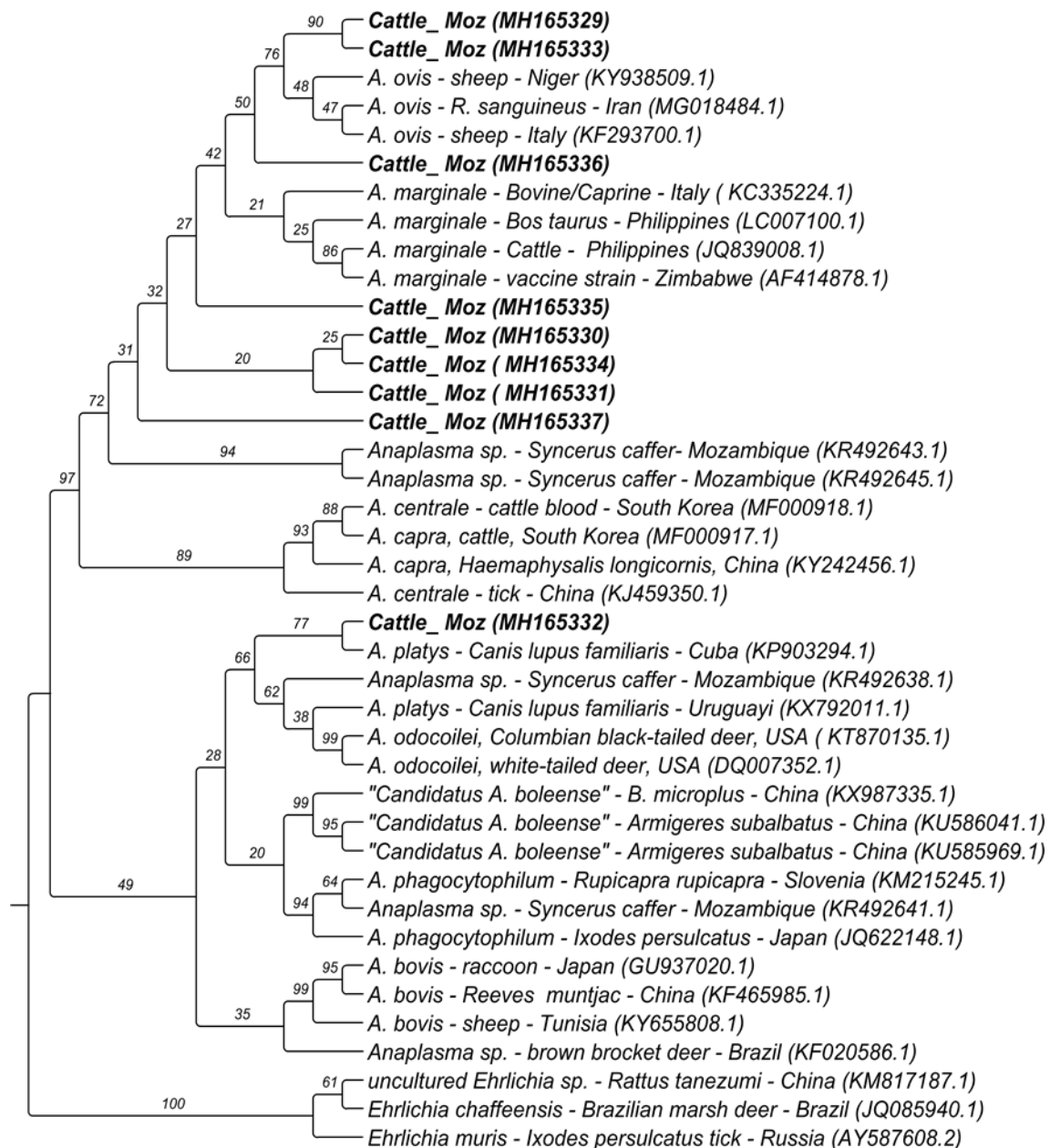


Figura 9. Posição filogenética das seqüências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene 16SrRNA. A árvore foi construída utilizando o método de análise de MV empregando o modelo evolutivo GTR+F+G4. Os números na árvore indicam valores de bootstrap para os pontos de ramificação. As seqüências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Seqüências de *Ehrlichia* sp. foram utilizadas como grupo externo.

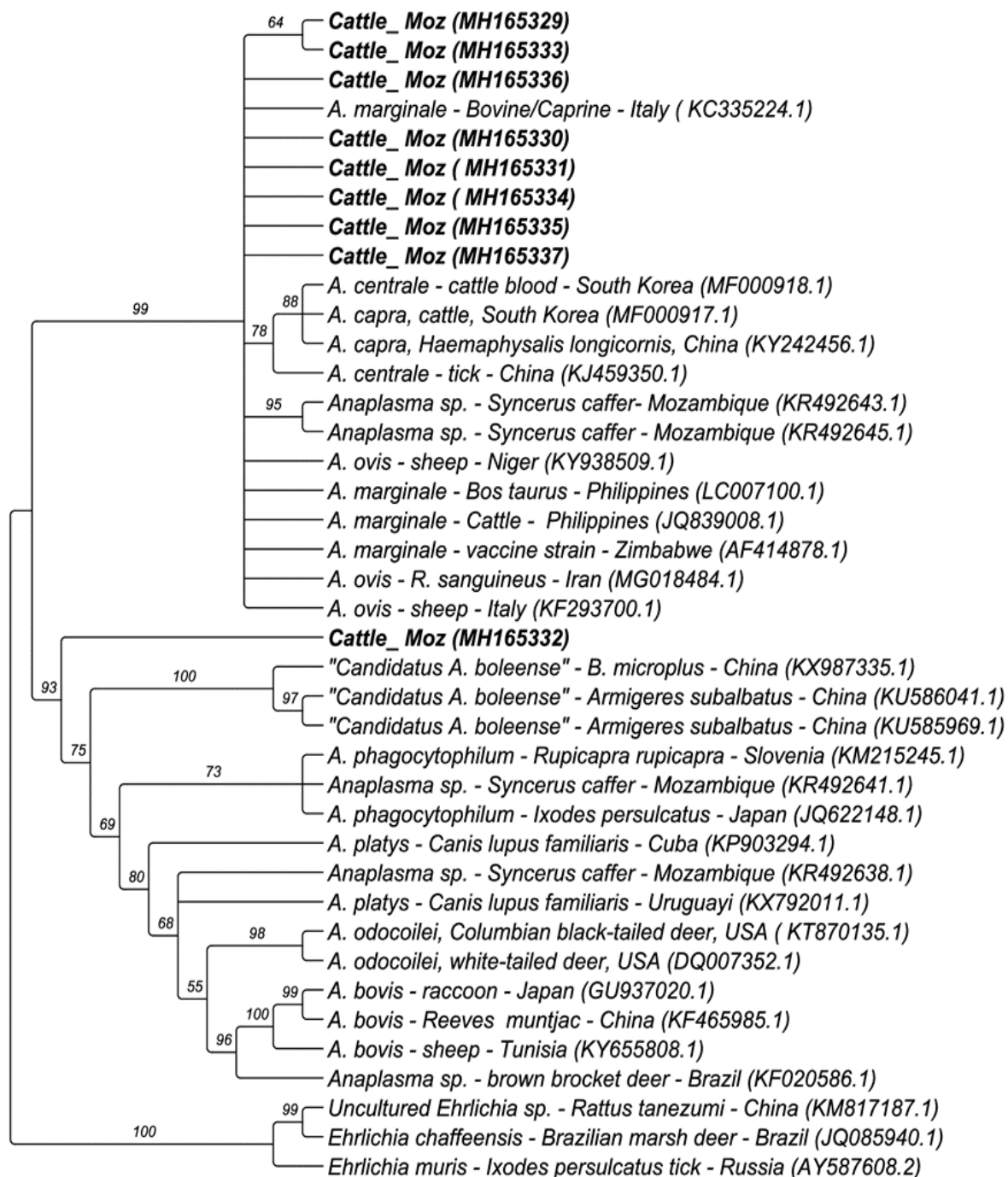


Figura 10. Posição filogenética das sequências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene 16SrRNA. A árvore foi construída utilizando o método de análise BI empregando o modelo evolutivo GTR+F+G4. Os números na árvore indicam valores de probabilidade posterior para os pontos de ramificação. As sequências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Sequências de *Ehrlichia* sp. foram utilizadas como grupo externo.

5.5. Ensaio de cPCR e inferência filogenética para *A. marginale* baseados em fragmento do gene *msp4* (De La Fuente, 2004).

Na PCR baseada em um fragmento do gene *msp4* de *Anaplasma* spp. (De La Fuente, 2004), 94% das amostras (47/50) mostraram-se positivas (**Figura 11**); destas, quinze (30%) foram encaminhadas para sequenciamento. Entretanto, após avaliação dos resultados do sequenciamento, apenas dez (20%) sequências de DNA puderam ser utilizadas na filogenia molecular (**Figuras 12 e 13**), análise de haplótipos (**Tabela 9**) e matriz de identidade (**Tabela 8**).

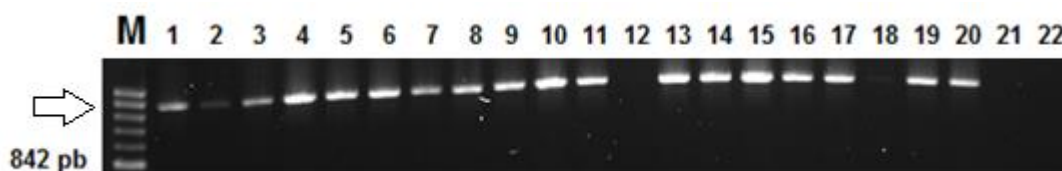


Figura 11. Resultados parciais da eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os amplicómeros relativos à PCR para *Anaplasma marginale* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores MSP45 e MSP43. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaletas 2 a 11, 13 a 17 e 19 e 20: amostras positivas; canaletas 12 e 18: negativas. Canaleta 1: controle positivo (*A. marginale*), e 22: controle negativo (água esterilizada ultrapura).

Todas as dez sequências obtidas apresentaram 100% de identidade para sequências de *A. marginale* detectadas na Índia. O sinal filogenético aferido pelo software TreePuzzle foi de 73.9% (**Tabela 7**). As inferências filogenéticas pelo método de BI (**Figura 11**) e MV (**Figura 12**) apresentaram resultados concordantes com todas as sequências dispostas no clado de *A. marginale*. A árvore BI (**Figura 11**), agrupou as sequências obtidas no clado de *A. marginale* representado por sequências originárias do Brasil, Porto Rico, Austrália, México, China, Venezuela e África do Sul com altos valores de *bootstrap* (86% a 100%). A árvore de MV (**Figura 12**) também posicionou as sequências obtidas próximas àquelas originárias das localidades mencionadas para a árvore BI; entretanto nossas sequências permaneceram mais relacionadas entre si, e com as sequências originárias do México e África do Sul, quando comparado ao posicionamento obtido na análise BI.

Na análise de polimorfismo e diversidade de haplótipos, apenas um haplótipo foi detectado entre as dez amostras analisadas para este gene (**Tabela 9**). A percentagem de identidade entre as sequências variou entre 75% a 100%.

Tabela 8. Matriz de identidade para as sequências *msp4* de *Anaplasma marginale* obtidas a partir de amostras de sangue de bovinos de Maputo, Moçambique.

	MH026093	MH071681	MH071682	MH071683	MH172462	MH172463	MH172464	MH172465	MH172466	MH172467
MH026093	ID	81%	81%	81%	93%	94%	87%	99%	92%	99%
MH071681	81%	ID	84%	85%	75%	75%	94%	80%	89%	83%
MH071682	81%	84%	ID	99%	86%	86%	90%	82%	87%	80%
MH071683	81%	85%	99%	ID	86%	86%	90%	81%	87%	80%
MH172462	93%	75%	86%	86%	ID	100%	80%	94%	85%	92%
MH172463	94%	75%	86%	86%	100%	ID	80%	95%	86%	92%
MH172464	87%	94%	90%	90%	80%	80%	ID	85%	94%	88%
MH172465	99%	80%	82%	81%	94%	95%	85%	ID	91%	97%
MH172466	92%	89%	87%	87%	85%	86%	94%	91%	ID	92%
MH172467	99%	83%	80%	80%	92%	92%	88%	97%	92%	ID

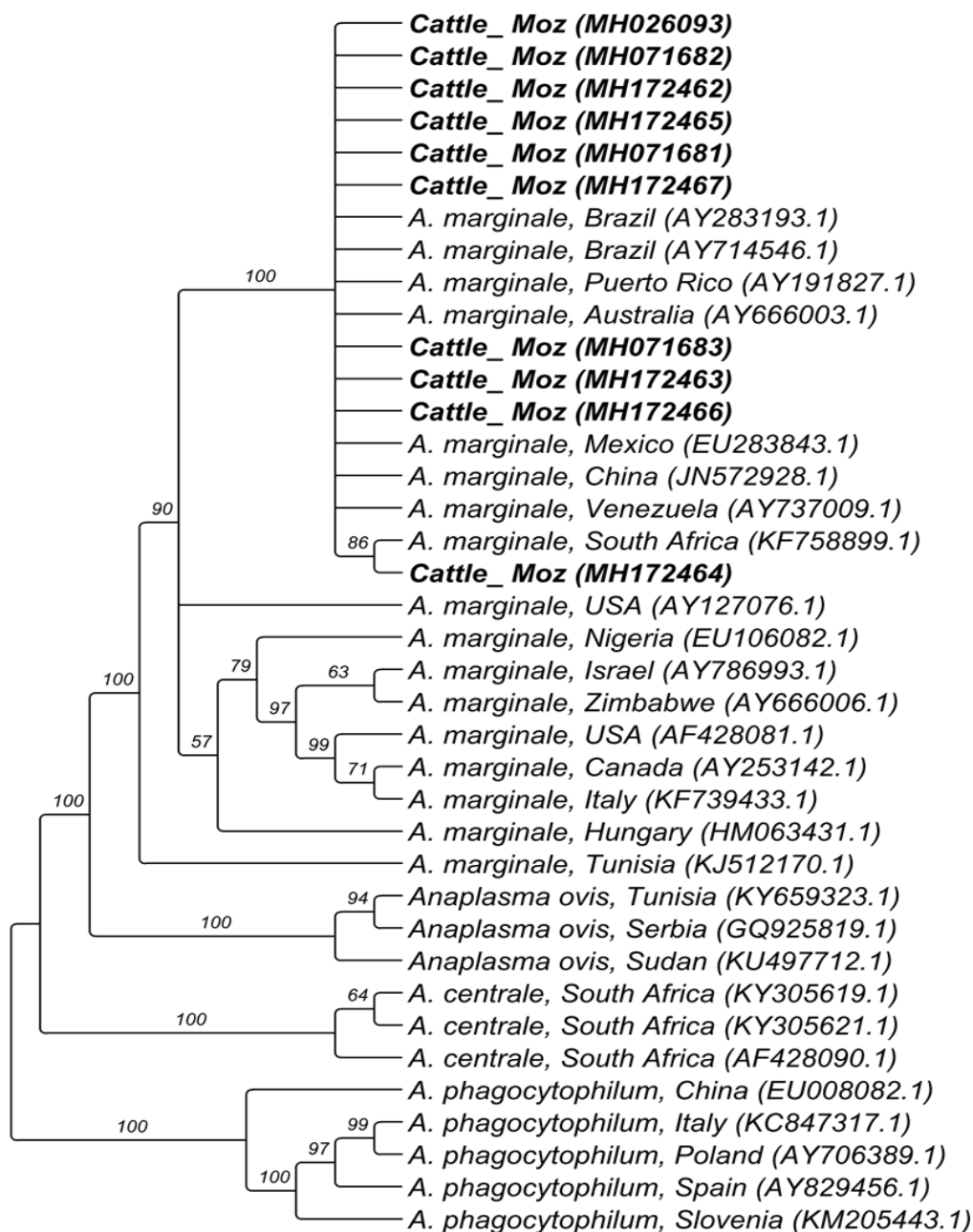


Figura 12. Posição filogenética das sequências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene *msp4*. A árvore foi construída utilizando o método de análise BI empregando o modelo evolutivo K2P+G4. Os números na árvore indicam valores de probabilidade posterior para os pontos de ramificação. As sequências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Sequências de *A. phagocytophilum* foram utilizadas como grupo externo.

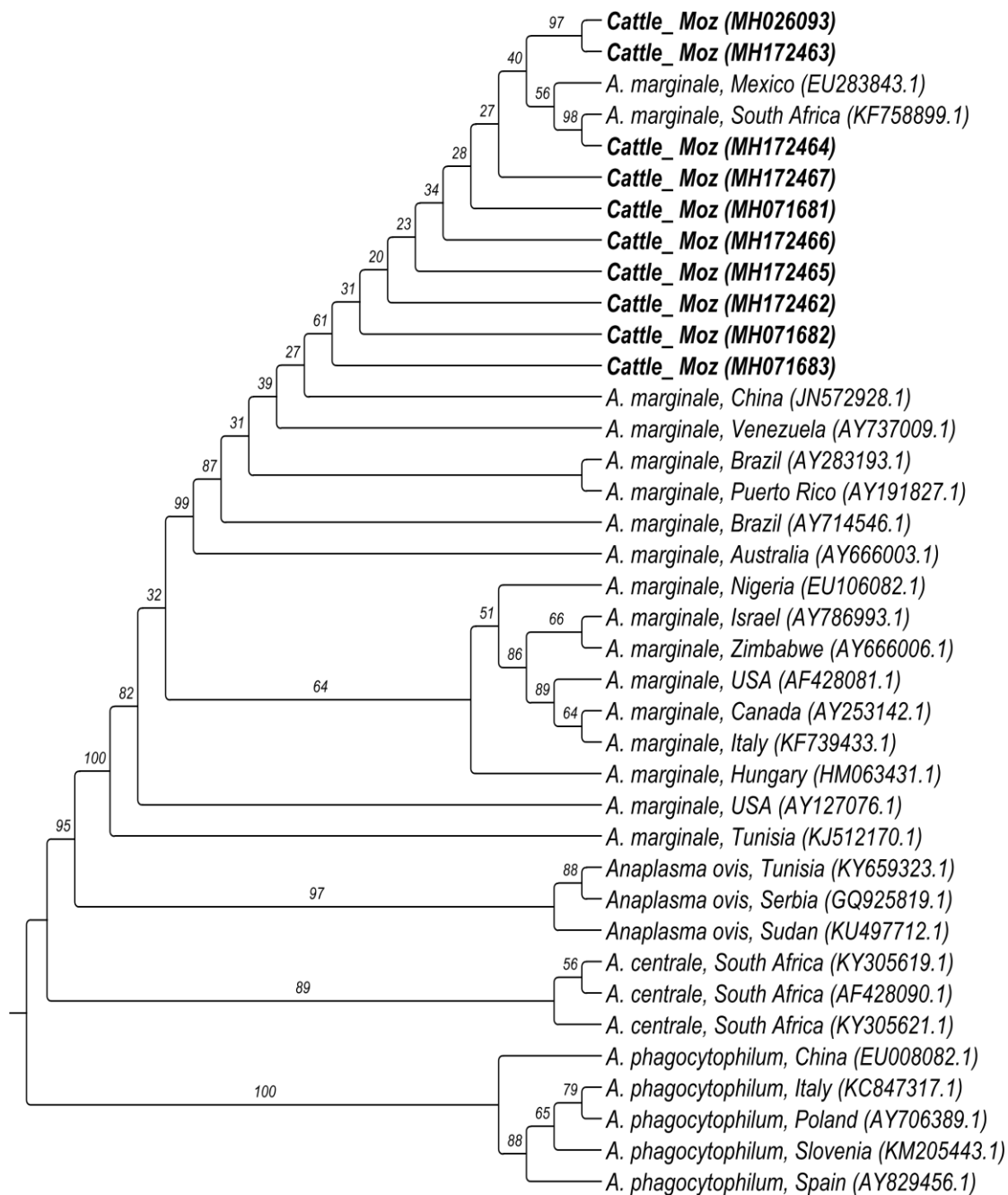


Figura 13. Posição filogenética das seqüências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene *msp4*. A árvore foi construída utilizando o método de análise de MV empregando o modelo evolutivo K2P+G4. Os números na árvore indicam valores de bootstrap para os pontos de ramificação. As seqüências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Seqüências de *A. phagocytophilum* foram utilizadas como grupo externo.

5.6. Ensaio de cPCR e inferência filogenética para *A. marginale* baseado em fragmento do gene *msp5* (ECHAIDE et al., 1998; SINGH et al., 2012).

Todas as amostras selecionadas (50/50) mostraram-se positivas na nested PCR direcionada ao gene *msp5* de *A. marginale* (protocolos de ECHAIDE et al., 1998; SINGH et al., 2012).

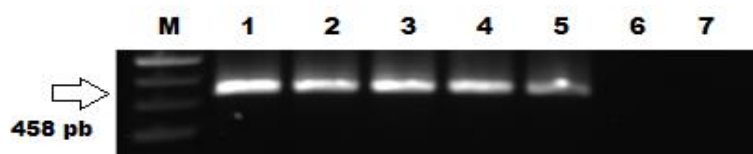


Figura 14. Resultados parciais de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os amplicómeros relativos à PCR para *Anaplasma marginale* obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores Amar *msp5* eR e Amar *msp5* iF. Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaletas 1 a 5 amostras positivas reamplificadas e com banda única.

Dentre as amostras positivas, sete foram encaminhadas ao sequenciamento, mas apenas quatro mostraram qualidade suficiente e foram empregadas na construção das árvores filogenéticas. Todas as sequências mostraram 100% de identidade com *A. marginale* previamente detectada no Egito (KU042083.1).

O sinal filogenético aferido pelo software TreePuzzle foi de 83% (**Tabela 7**). Na inferência filogenética pelo método MV (**Figura 15**), todas as amostras agruparam-se em um único clado contendo sequências de *A. marginale*, com valores de bootstrap elevados (82% a 90%) nos ramos externos e variando entre 39% a 100% nos ramos internos. Nossas sequências compartilharam o clado com outras oriundas das Filipinas, China, Moçambique, Cuba, Egito e Estados Unidos. Na árvore filogenética pelo método BI (**Figura 16**), uma sequência agrupou-se entre sequências de *Anaplasma* sp. originárias de búfalos selvagens amostrados na reserva Marromeu em Moçambique, com índice de probabilidade posterior entre 99% e 100%. Quanto à análise de haplótipos representada na **Tabela 9**, dois haplótipos diferentes foram encontrados entre as quatro sequências analisadas para este gene. A porcentagem de identidade entre as sequências obtidas variou entre 32% a 92% (**Tabela 10**).

Tabela 9. Análise de haplótipos para os genes *msp4* e *msp5* de *Anaplasma marginale*.

Espécie e gene alvo	(pb)	N	VS	GC %	h	hd (mean ± SD)	π (mean ± SD)	K
<i>A. marginale</i> (<i>msp4</i>)	841	10	24	50.2	1	0,933 ±0.077	0.009 ± 0.0022	7.244
<i>A. marginale</i> (<i>msp5</i>)	442	7	37	43.9	2	0.857 ±0.137	0.05351±0.02461	11.238

N, número de seqüências analisadas; VS, número de sítios variáveis; GC, conteúdo G + C; h, número de haplótipos; hd, diversidade de haplótipos; SD, desvio padrão; π , diversidade de nucleotídeos (por local = PI); K, número médio de diferença de nucleotídeos.

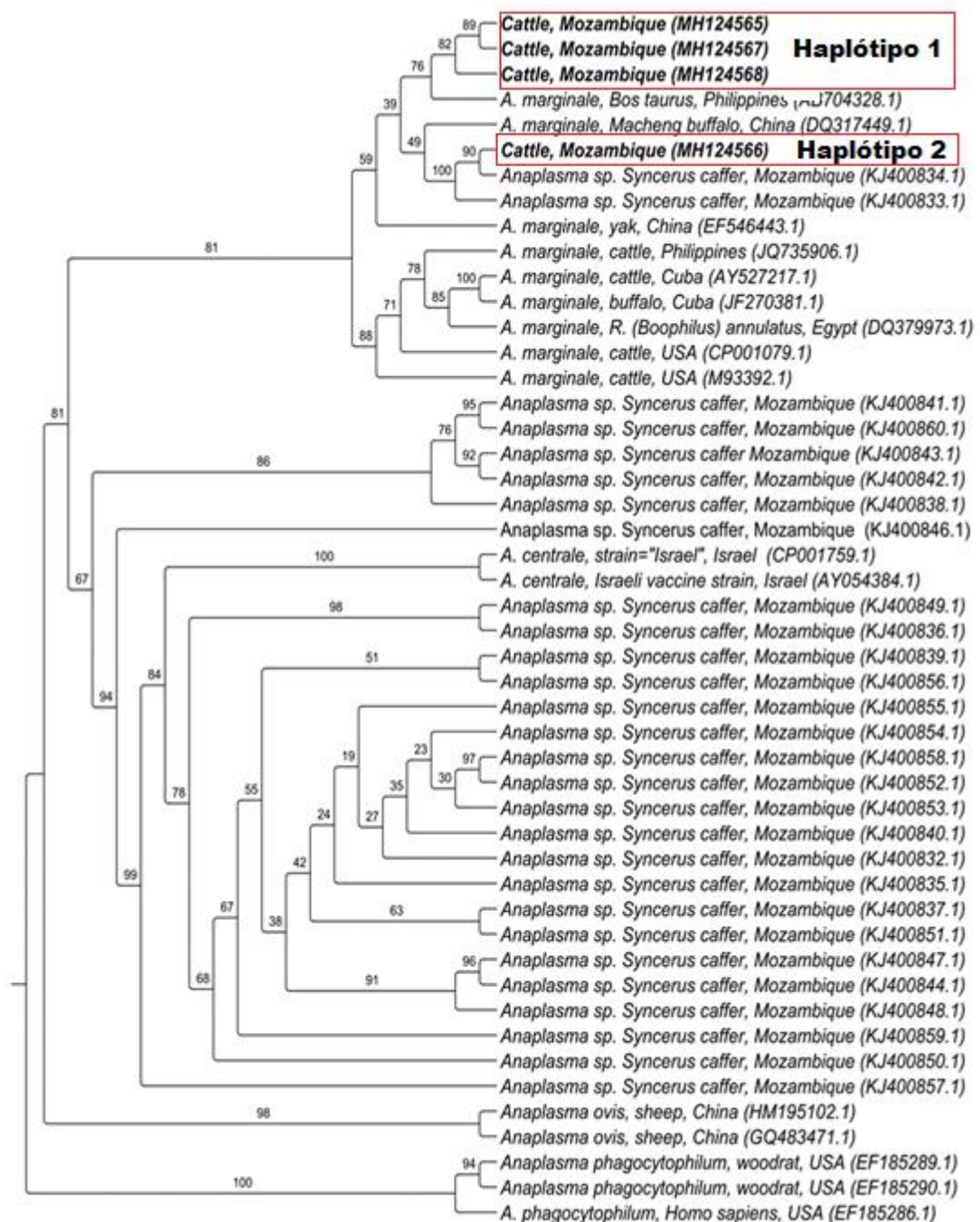


Figura 15. Posição filogenética das seqüências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene *msp5*. A árvore foi construída utilizando o método de análise de MV empregando o modelo evolutivo TIM3+G. Os números na árvore indicam valores de bootstrap para os pontos de ramificação. As seqüências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Seqüências de *A. phagocytophilum* foram utilizadas como grupo externo.

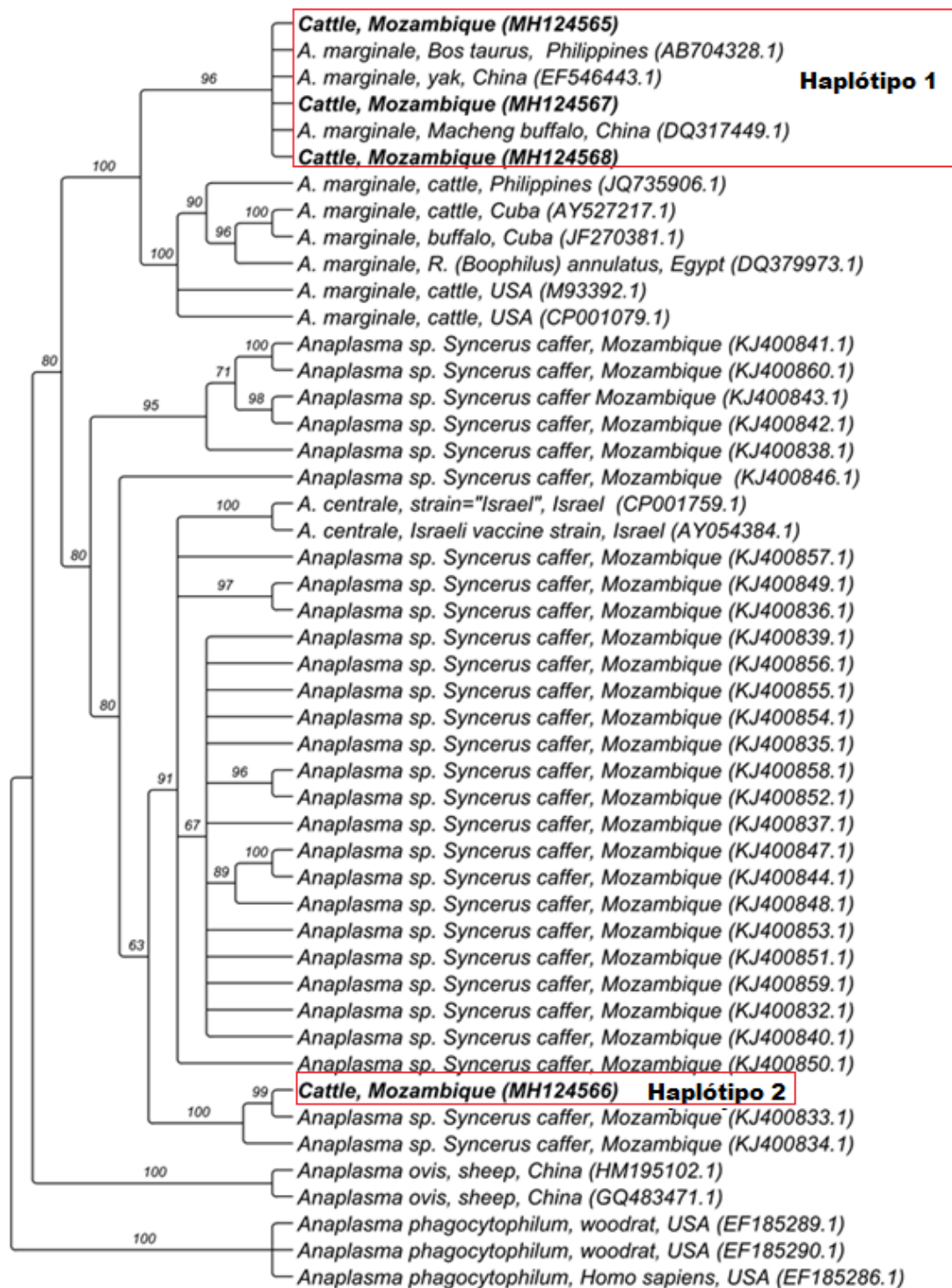


Figura 16. Posição filogenética das sequências de *Anaplasma* sp. detectadas em bovinos da província de Maputo, Moçambique; com base no gene *msp5*. A árvore foi construída utilizando o método de análise BI empregando o modelo evolutivo TIM3+G. Os números na árvore indicam valores de probabilidade posterior para os pontos de ramificação. As sequências obtidas no estudo encontram-se destacadas em negrito. Sequências de *A. phagocytophilum* foram utilizadas como grupo externo.

Tabela 10. Matriz de identidade para as sequências *msp5* de *Anaplasma marginale* obtidas a partir de amostras de sangue de bovinos de Maputo, Moçambique.

	MH124565	MH124566	MH124567	MH124568
MH124565	ID	39%	92%	77%
MH124566	39%	ID	34%	32%
MH124567	92%	34%	ID	70%
MH124568	77%	32%	70%	ID

5.7. Ensaio de cPCR e inferência filogenética para *Anaplasma* sp. baseados no operon *groEL* (SUMMER et al., 1997; LOTRIC-FURLAN et al., 1998; NICHOLSON et al., 1999).

Por fim, 22% (11/50) das amostras selecionadas mostraram-se positivas na nested PCR baseada no gene *groEL* (protocolos de SUMMER et al., 1997; LOTRIC-FURLAN et al., 1998; NICHOLSON et al., 1999).

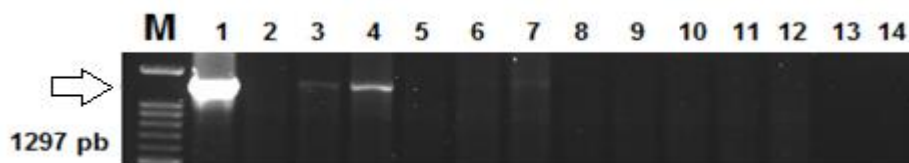


Figura 17. Resultados parciais da Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando os amplicómeros relativos à PCR para *Anaplasma* sp. obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores HS43 e HSVR: Canaleta M: marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); Canaletas 3 e 4: amostras positivas, canaletas 2, e de 5 a 12: amostras negativas. Canaleta 1: controle positivo (*A. phagocytophilum*) e 14: controle negativo (água esterilizada ultrapura).

Embora sete amostras tenham sido enviadas para sequenciamento, apenas uma sequência de DNA (MG763748) pôde ser empregada nas análises filogenéticas, a qual mostrou 96% de identidade para *A. platys* pelo BLAST.

O sinal filogenético aferido pelo software TreePuzzle foi de 89,4% (**Tabela 7**). Nas análises filogenéticas pelos métodos de BI e MV (**Figuras 18 e 19**) verificou-se um posicionamento semelhante entre as espécies de *Anaplasma* nas duas árvores filogenéticas. A sequência obtida no presente estudo posicionou-se no clado de *A.*

platys com outras previamente detectadas em Portugal, Argentina e Filipinas. *Anaplasma odocoilei* (JX8766421), detectado em veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) nos Estados Unidos, foi posicionado proximamente a estas sequências.

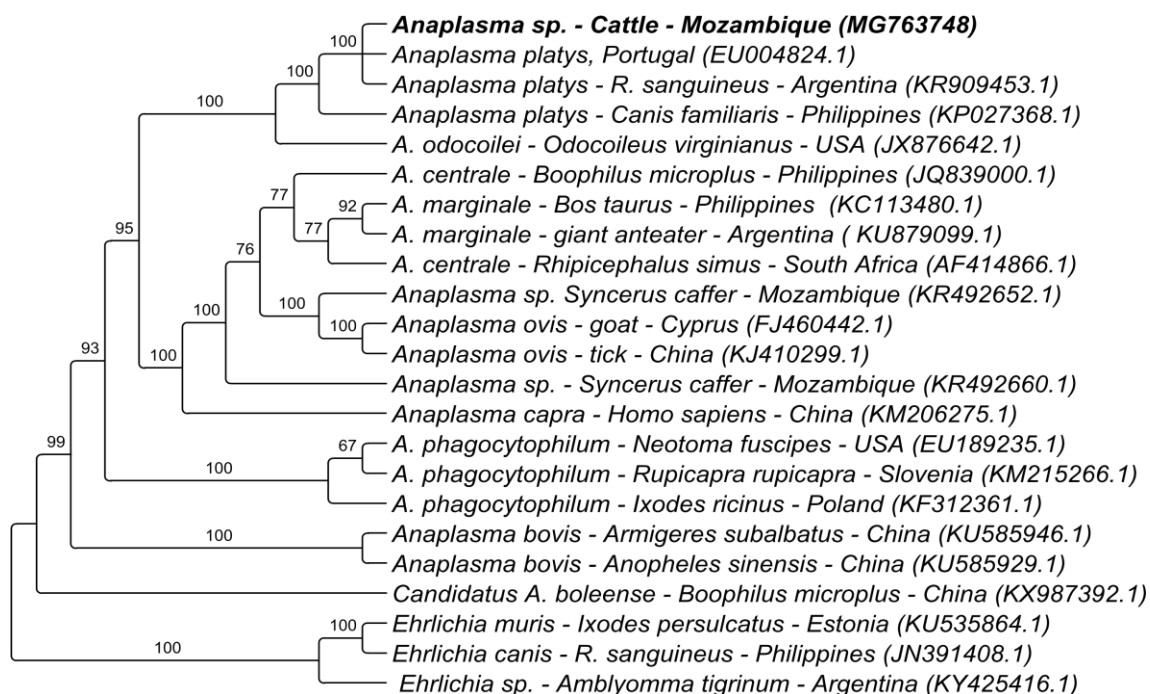


Figura 18. Posição filogenética da sequência de *Anaplasma* sp. detectada em bovino da província de Maputo, Moçambique; com base no gene *groEL*. A árvore foi construída utilizando o método de análise BI empregando o modelo evolutivo GTR+I+G. Os números na árvore indicam valores de probabilidade posterior para os pontos de ramificação. A sequência obtida no estudo encontra-se destacada em negrito. Sequências de *Ehrlichia* sp. foram utilizadas como grupo externo.

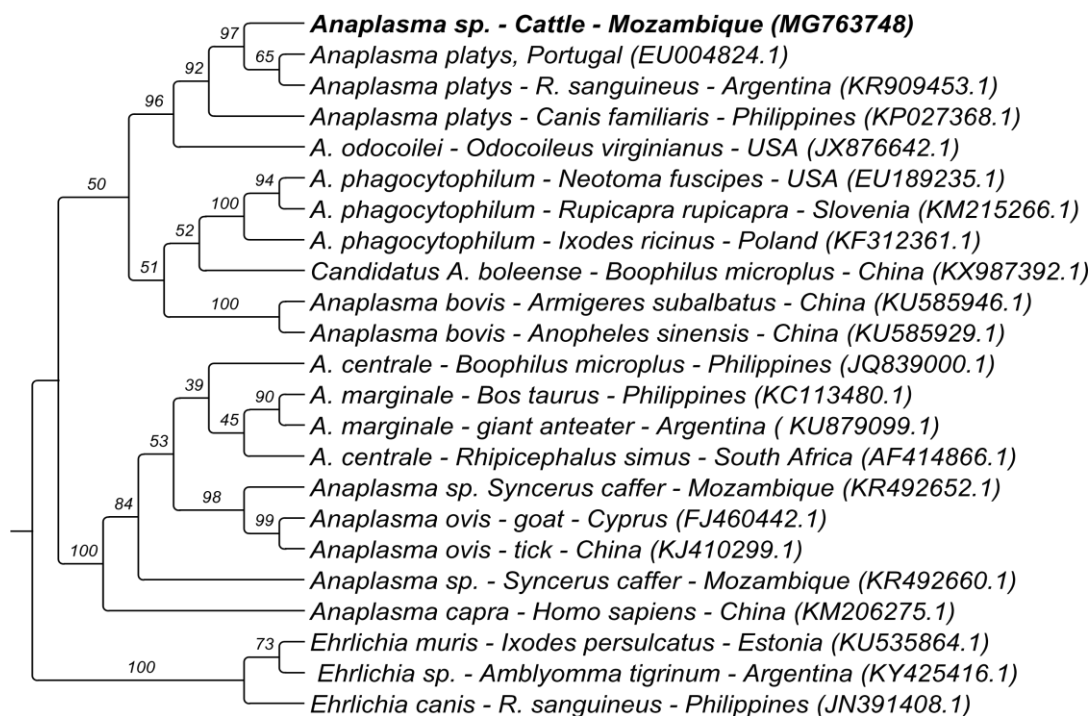


Figura 19. Posição filogenética da sequência de *Anaplasma* sp. detectada em bovino da província de Maputo, Moçambique; gene *groEL*. A árvore foi construída utilizando o método de análise de MV e empregando o modelo evolutivo GTR+I+G. Os números na árvore indicam valores de bootstrap para os pontos de ramificação. A sequência obtida no estudo encontra-se destacada em negrito. Sequências de *Ehrlichia* sp. foram utilizadas como grupo externo.

6.0. DISCUSSÃO

Anaplasma spp. filogeneticamente associados a *A. marginale*, *A. centrale*, *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *A. ovis*, e 'Candidatus *A. booleense*' foram detectados em bovinos amostrados de Maputo, Moçambique. Por outro lado, utilizando metodologia semelhante, Machado et al. (2016) não detectaram *Anaplasma* spp. filogeneticamente associados a *A. ovis* e 'Candidatus *A. booleense*' em búfalos africanos em Moçambique. Tais achados enfatizam a necessidade da utilização de diferentes protocolos de PCR baseados em distintas regiões gênicas a fim de explorar a diversidade de genótipos e espécies em uma dada amostra biológica. Diferentes oligonucleotídeos iniciadores mostram sensibilidade e especificidade distintas para espécies de *Anaplasma* spp.

Os resultados obtidos nos testes sorológicos e moleculares mostram alta exposição de bovinos a *Anaplasma* spp. na província de Maputo, Moçambique. Ao compararmos a taxa de soroprevalência para *A. marginale* encontrada no presente estudo (86,3%) com a de outros estudos já anteriormente realizados em Moçambique, observa-se resultados semelhantes àquele encontrado (76,5%) por Tembue et al. (2011) em bovinos também na região Sul do país, por meio de um iELISA com antígeno de *msp5* recombinante de *A. marginale*. Já na região norte do país, Alfredo et al. (2005), utilizando teste de aglutinação para *A. marginale*, relataram soroprevalência de 63% para o referido agente entre a população de bovinos amostrados. Nossos resultados evidenciaram uma maior taxa de soroprevalência para *A. marginale* em animais amostrados no distrito de Boane (95,7%), e uma menor taxa para bovinos amostrados em Moamba (65%). Curiosamente, enquanto o controle de carrapatos era realizado quinzenalmente em Boane, tal manejo era realizado de maneira irregular em Moamba, apenas quando eram visibilizados carrapatos. Por outro lado, em Boane havia presença de bovinos mestiços, que tendem a ser mais suscetíveis a doenças transmitidas por carrapatos (TEMBUE, 2012).

A província de Maputo parece apresentar estabilidade enzoótica para *A.*

marginale. Criadores de gado consideraram carrapatos e moscas hematófagas como sendo os principais ectoparasitas presentes em bovinos nesta região (NORVAL et al., 1978; MELTZER, 1996; TEMBUE, 2012). De Matos (2008), ao relatar as espécies de carrapatos ixodídeos mais prevalentes em Maputo, destacou a ocorrência de *A. hebraeum*, *R. (B.) microplus*, *R. appendiculatus*, *R. evertsi evertsi*, *R. simus* e *H. elliptica*, haja vista sua alta prevalência e potencial de agentes patogênicos. Todas as espécies de carrapatos acima elencadas, com exceção de *H. elliptica*, são ectoparasitas de grande importância econômica na atividade pecuária na região sob estudo.

Um total de 36 amostras apresentaram resultados discordantes entre as técnicas de iELISA e qPCR para *A. marginale*. Os animais positivos na qPCR e negativos na sorologia possivelmente se encontravam na fase aguda da infecção, quando o nível de anticorpos mostrava-se abaixo do limiar de detecção da técnica de ELISA. Por outro lado, animais positivos na sorologia e negativos na qPCR possivelmente se encontravam na fase crônica da anaplasmose, onde o número de bactérias circulantes encontrava-se abaixo do limiar de detecção do ensaio molecular utilizado; ainda, animais que foram expostos ao patógeno anteriormente, poderiam apresentar anticorpos residuais por um longo período. Tais achados reforçam a relevância do emprego de diferentes métodos de detecção de patógenos, para melhor auxiliar na conclusão de um diagnóstico e na condução de levantamentos epidemiológicos.

Para o gene *msp1β* de *A. marginale* (CARELLI et al., 2007), 97,3% das amostras mostraram-se positivas na qPCR. Anteriormente, Machado et al. (2016) encontraram, utilizando o mesmo protocolo, 72,2% (70/97) de positividade para *A. marginale* entre uma população de búfalos africanos (*Syncerus caffer*) oriundos da Reserva de Marrromeu, em Moçambique. Ainda utilizando o mesmo protocolo, uma taxa de positividade de 75,9% (192/253) para o agente sob estudo foi reportada por Elelu et al. (2016) em bovinos na Nigéria. Pothmann et al. (2016), ao empregarem o mesmo protocolo, relataram uma ocorrência de 89,7% (192/214) para *A. marginale* entre bovinos amostrados em Madagascar.

Em nosso estudo, 2,7% das amostras mostraram-se positivas na qPCR para *A. phagocytophilum* direcionada ao gene *msp2*. Machado et al. (2016) relataram que

todos os búfalos amostrados na região de Marromeu, Moçambique, mostraram-se negativos na qPCR para *A. phagocytophilum*. Embora a frequência de *A. phagocytophilum* tenha sido baixa entre os bovinos amostrados, não se deve descartar o risco de disseminação deste agente em rebanhos bovinos em Moçambique. Além do potencial zoonótico apresentado por esta bactéria, *A. phagocytophilum* também pode causar a febre da pastagem em bovinos, e a febre transmitida por carrapatos em caprinos e ovinos (WOLDEHIWET, 2006; BATTILANI et al., 2017). Animais infectados com *A. phagocytophilum*, mesmo que em baixa parasitemia, poderiam atuar como reservatórios, facilitando a transmissão deste agente para outros rebanhos bovinos ou para outros ruminantes. Ademais, *A. phagocytophilum* foi associado à predisposição para infecções secundárias, devido aos danos causados na atividade de granulócitos (ANDERSSON et al., 2017). Futuros estudos em Moçambique são necessários para avaliar variações sazonais, áreas de ocorrência e carrapatos vetores entre ruminantes domésticos e selvagens. Ainda, a ocorrência do referido agente em outros potenciais reservatórios, como roedores, deve ser melhor investigada no país.

No que diz respeito à detecção de *Anaplasma* spp. utilizando protocolos de cPCR, os índices de sinal filogenético obtidos através do software TreePuzzle foram superiores a 70% para todos os genes utilizados no presente estudo, garantindo maior confiabilidade às análises filogenéticas das sequências avaliadas.

Na cPCR baseada no gene 16S rRNA, taxas de positividade de 87,2% (191/219) e 100% (50/50) foram encontradas pelos protocolos de Massung et al. (1998) e Zobba et al. (2014), respectivamente. Para o primeiro protocolo, as amostras mostraram identidade com sequências previamente descritas de *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *Anaplasma* sp. detectado em bovinos da Etiópia e veados-catingueiros no Brasil, além de 'Candidatus *Anaplasma boleense*'. Este último agente, relatado pela primeira vez em carrapatos da espécie *Hyalomma asiaticum* na região de Bole na China (KANG et al., 2014), posteriormente foi detectado no mesmo país por Guo et al. (2016) em espécimes de *Aedes albopictus*, *Anopheles sinensis*, *Armigeres subalbatus*, e *Culex quinquefasciatus*. Interessantemente, uma sequência detectada em nosso estudo, além de apresentar alta identidade (100%) para 'Candidatus *A. boleense*' na análise pelo BLAST, foi posicionada no mesmo

clado que este novo *Candidatus* de *Anaplasma*. Desta forma, futuros estudos objetivando investigar a capacidade vetorial de mosquitos na transmissão desses novos genótipos de *Anaplasma* em Moçambique são necessários. Por outro lado, as sequências obtidas pelo protocolo de Zobba et al. (2014) mostraram identidade com *Anaplasma centrale*, *A. marginale*, *Anaplasma* sp. (detectado em búfalo na África do Sul), *A. platys* e *A. ovis*. Ainda que *A. marginale* tenha sido detectada na qPCR para *msp1β* com uma altíssima frequência, sua ocorrência foi pouco observada em ensaios de cPCR baseados no gene 16S rRNA.

Uma sequência 16S rRNA (MH165336) obtida pelo protocolo de Zobba et al. (2014) apresentou identidade de 100% para *A. ovis* por meio da análise pelo BLAST. Entretanto, agrupou-se juntamente a uma sequência de *A. marginale* (KC335224) pela análise BI, enquanto pelo método de MV ficou posicionada isoladamente, entre sequências de *A. ovis* e *A. marginale*. A característica conservada do gene 16S rRNA não permitiu afirmar com robustez a real identidade desse genótipo circulante em bovinos em Moçambique. *Anaplasma ovis* já foi molecularmente detectado por Matsimbe et al. (2017) em 6,7% (1/15) de espécimes de *Rhipicephalus microplus* colhidas de bovinos em Moçambique. Futuros estudos devem ser conduzidos a fim de investigar a capacidade vetorial desta espécie de carrapato na transmissão de *A. ovis*. Trabalhos com o intuito de detectar agentes Anaplasmataceae em carrapatos coletados de ruminantes provenientes de Moçambique ainda são escassos, e ajudariam na compreensão sobre a distribuição e prevalência dos referidos patógenos na região. Na Mongólia, Ochirkhuu et al. (2017) detectaram *A. ovis* em diferentes espécies de ruminantes por meio de ensaios de PCR baseados nos genes *groEL* e *msp4*. Inferências filogenéticas baseadas no gene *groEL* posicionaram as sequências de *A. ovis* em dois clados, sendo um deles ocupado principalmente por sequências de ovelhas e cabras, e o outro por sequências oriundas de bovinos, revelando duas variedades divergentes de *A. ovis* (OCHIRKHUU et al., 2017).

A ocorrência de politomias nos clados ocupados por sequências de *A. platys*, *A. phagocytophilum* e *A. marginale* na árvore (BI) construída com sequências 16S rRNA, obtidas pelo protocolo de Massung et al. (1998), possivelmente foram geradas pela alta conservação do gene-alvo utilizado. Todavia, o referido gene ainda é bastante utilizado na identificação de novos genótipos, dada a sua alta conservação.

As amostras (MH169140, MH169169, MH169177) embora tenham se mostrado positivas na qPCR para *A. phagocytophilum* baseada no gene *msp2*, sequências 16S rRNA de *Anaplasma* sp. obtidas destas mesmas amostras as posicionaram mais próximas de *A. platys* na análise filogenética pelo método BI. Adicionalmente, considerando que os Cqs obtidos na qPCR para *A. phagocytophilum* destas amostras mostraram-se elevados (42.48; 39.96; 24.27 – valores para MH169169, MH169140, e MH169177, respectivamente), possivelmente a PCR convencional baseada no gene 16S rRNA não tenha sido capaz de amplificar DNA deste agente nas amostras. Tais animais possivelmente estavam coinfectados com genótipo filogeneticamente associado a *A. platys*, cujo gene 16S rRNA foi amplificado nos ensaios de cPCR empregados. Desta forma, embora encontremos genótipos filogeneticamente mais associados a *A. platys* nos bovinos amostrados, análises filogenéticas adicionais baseadas em outras regiões gênicas menos conservadas são necessárias a fim de inferir com maior robustez o posicionamento filogenético dos novos genótipos encontrados. Dahmani et al. (2015), ao empregarem uma qPCR baseada no gene 23S rRNA com o intuito de detectar agentes Anaplasmataceae, identificaram três variantes genéticas de *A. phagocytophilum*, *A. platys* e *Anaplasma* sp. em amostras de sangue de bovinos na Algéria. Ainda, genótipos de *Anaplasma* sp. filogeneticamente associados a *A. platys* também foram detectados em cervídeos (*Blastocerus dichotomus*) de vida livre amostrados no Brasil (SACCHI et al., 2012) e em búfalos selvagens em Moçambique (MACHADO et al., 2016). Futuros estudos objetivando investigar mecanismos de “spillover” deste genótipo filogeneticamente associado a *A. platys* de ruminantes selvagens para bovinos são necessários, assim como a espécie de carrapato envolvida em sua transmissão.

A única sequência (MG763748) do operon *groEL* obtida no presente estudo mostrou-se filogeneticamente relacionada a *A. platys*. Por outro lado, Machado et al. (2016), ao submeterem amostras de sangue de búfalos africanos (*Syncerus caffer*) a protocolos de detecção de *Anaplasma* sp. baseados no mesmo gene, encontraram sequências filogeneticamente próximas a *A. centrale* e *A. marginale*. A sequência de *A. platys* obtida em nosso estudo foi oriunda de um bovino da raça Nguni no distrito de Moamba. Na referida região são encontrados antílopes e gazelas, os quais

poderiam atuar como possíveis reservatórios para esta espécie de *Anaplasma*.

Embora politomias tenham sido encontradas na árvore filogenética de *msp4* de *Anaplasma* sp. pelo método de BI, nossas sequências foram dispostas no clado ocupado apenas por *A. marginale*, de forma que os resultados obtidos na análise pelo BLAST e posicionamento filogenético mostraram-se congruentes. Um único haplótipo de *A. marginale* foi detectado entre as dez sequências avaliadas, possivelmente devido à alta similaridade entre as sequências avaliadas. Apenas uma sequência (MH172464) manteve-se isolada das outras, e próxima à sequência KF758899, detectada na África do Sul. Infelizmente, no estudo conduzido por Machado et al. (2016) a respeito de diversidade de *Anaplasma* spp. em búfalos africanos, este alvo-gênico não foi utilizado nas inferências filogenéticas, impedindo comparar nossas sequências *msp4* de *A. marginale* com aquelas circulantes neste grupo de ruminantes selvagens em Moçambique.

Enquanto neste estudo as sequências *msp5* de *Anaplasma* sp. obtidas, foram alocadas apenas no clado de *A. marginale*, aquelas detectadas por Machado et al. (2016) em búfalos em Moçambique distribuíram-se entre os cladogramas ocupados por *A. centrale* e *A. marginale*. Dois haplótipos diferentes foram detectados entre as quatro sequências avaliadas. As sequências MH124565, MH124567 e MH124568 posicionadas no topo da árvore pertenciam ao mesmo haplótipo. Futuros estudos objetivando a genotipagem dos isolados de *A. marginale* por meio de análises do gene *msp-1 α* são necessários a fim de melhor investigar a diversidade desse agente em ruminantes de Moçambique.

Os diferentes protocolos de PCR baseados em diferentes regiões gênicas permitiram detectar a presença de diversas espécies e/ou genótipos de *Anaplasma* sp. circulando entre bovinos amostrados em Maputo, Moçambique: *A. marginale*, *A. centrale*, *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *A. ovis*, e 'Candidatus *Anaplasma boleense*'.

Embora os prejuízos econômicos causados pela infecção por *A. marginale* em rebanhos bovinos já sejam bem conhecidos em termos mundiais, o potencial patogênico dos outros genótipos e/ou espécies relatados em nosso estudo ainda são desconhecidos. Ademais, os efeitos gerados pela coinfeção por múltiplos genótipos/espécies de *Anaplasma* spp. e outros hemoparasitas (*Babesia* spp., *Theileria* spp., *Trypanosoma* spp.) são desconhecidos. Ainda, diante da diversidade

de *Anaplasma* spp. observada, incluindo a circulação de *A. phagocytophilum* nos rebanhos estudados, futuros estudos objetivando a análise genotípica deste último agente no país são necessários, a fim de se estimar o real risco à saúde humana em Moçambique.

7.0. CONCLUSÕES

- Bovinos amostrados nos distritos de Boane, Magude, Matutuíne, Moamba e Namaacha, em Maputo, Moçambique, estão expostos a espécies de *Anaplasma*;
- O método sorológico (iELISA) indicou uma alta taxa de soroprevalência para *A. marginale* em bovinos amostrados em Maputo;
- As técnicas moleculares baseadas em diferentes alvos gênicos (*msp1 β* , *msp2*, 16S rRNA, *msp4*, *msp5* e *groEL*) evidenciaram a circulação de diferentes espécies de *Anaplasma* em bovinos amostrados em Moçambique: *A. marginale* (agente da anaplasmoze bovina), *A. phagocytophilum* (agente da anaplasmoze granulocítica humana), *A. platys*, *A. centrale*, *A. ovis*, e ‘*Candidatus Anaplasma boleense*’;
- As análises de haplótipos de *A. marginale* com base em sequências dos genes *msp4* e *msp5*, evidenciaram 1 e 2 haplótipos circulantes para cada gene, respectivamente.

8.0. REFERÊNCIAS

ALFREDO, A. A.; JONSSON, N. N.; FINCH, T. M.; NEVES, L.; MOLLOY, J. B.; JORGENSEN, W. K. Serological survey of *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle in Tete Province, Mozambique. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 37, n. 3, p. 121-131, 2005.

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

ANDERSSON, M.O.; VÍCHOVÁ, B.; TOLF, C.; KRZYZANOWSKA, S.; WALDENSTRÖM, J. KARLSSON, M.E. Co-infection with *Babesia divergens* and *Anaplasma phagocytophilum* in cattle (*Bos taurus*), Sweden. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, Amsterdam v. 8, n. 6, p. 933-935, 2017.

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.

ARRAGA-ALVARADO, C. M.; QUROLLO, B. A.; PARRA, O. C.; BERRUETA, M. A.; HEGARTY, B. C.; BREITSCHWERDT, E. B. Molecular evidence of *Anaplasma platys* infection in two women from Venezuela. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 91, n. 6, p. 1161-1165, 2014.

ARULKANTHAN, A.; BROWN, W. C.; McGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing *msp1a* of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 7, p. 3481-3487, 1999.

BAKKEN, J. S.; DUMLER, J. S. Human granulocytic anaplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 29, n. 2, p. 341-55, 2015.

BAKKEN, J. S.; KRUETH, J. K.; LUND, T.; MALKOVITCH, D.; ASANOVICH, K.; DUMLER, J. S. Exposure to deer blood may be a cause of human granulocytic ehrlichiosis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 23, n. 1, p. 198, 1996.

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

BATTILANI, M.; DE ARCANGELI, S.; BALBONI, A.; DONDI, F. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, Amsterdam, v. 49, p. 195-211, 2017.

BEKKER, C. P.; DE VOS, S.; TAOUFIK, A.; SPARAGANO, O. A.; JONGEJAN, F. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 223-238, 2002.

BELL-SAKYI, L.; PALOMAR, A. M.; BRADFORD, E. L.; SHKAP, V. Propagation of the Israeli vaccine strain of *Anaplasma centrale* in tick cell lines. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 179, n. 3-4, p. 270-276, 2015.

BENEVENUTE, J. L.; DUMLER, J. S.; OGRZEWALSKA, M.; ROQUE, A. L. R.; MELLO, V. V. C.; de SOUSA, K. C. M.; GONÇALVES, L. R.; D'ANDREA, P. S.; de SAMPAIO LEMOS, E. R.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Assessment of a quantitative 5' nuclease real-time polymerase chain reaction using *groEL* gene for *Ehrlichia* and *Anaplasma* species in rodents in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, Amsterdam, v. 8, n. 4, p. 646-656, 2017.

BEN SAID, M.; BELKAHIA, H.; MESSADI, L. *Anaplasma* spp. in North Africa: A review on molecular epidemiology, associated risk factors and genetic characteristics. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 543-555, 2018.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003.

BRADWAY, D. S.; TORIONI de ECHAIDE, S.; KNOWLES, D. P.; HENNAGER, S. G.; McELWAIN, T. F. Sensitivity and specificity of the complement fixation test for detection of cattle persistently infected with *Anaplasma marginale*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, Thousand Oaks, v. 13, n. 1, p. 79-81, 2001.

BRAYTON, K. A.; KAPPMAYER, 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. 3, p. 844-849, 2005.

BROWN, G. K.; MARTIN, A. R.; ROBERTS, T. K.; DUNSTAN, R. H. Molecular detection of *Anaplasma platys* in lice collected from dogs in Australia. **Australian Veterinary Journal**, New South Wales, v. 83, n. 1-2, p. 101-102, 2005.

CARDOSO, L.; GILAD, M.; CORTES, H. C.; NACHUM-BIALA, Y.; LOPES, A. P.; VILA-VIÇOSA, M. J.; SIMÕES, M.; RODRIGUES, P. A.; BANETH, G. First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmaniainfantum* in foxes from Portugal. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, p. 144-151, 2015.

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 sample of cattle by real, time PCR. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 124, n.1-2, p. 107-114, 2007.

CASTRO, M. B.; NICHOLSON, W. L.; KRAMER, V. I.; CHILDS, J. E. Persistent infection in *Neotoma fuscipes* (Muridae: Sigmondontinae) with *Ehrlichia phagocytophila sensu lato*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 65, n. 4, p. 261-267, 2001.

CHOCHLAKIS, D.; IOANNOU, I.; TSELENTIS, Y.; PSAROULAKI, A. Human anaplasmosis and *Anaplasma ovis* variant. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 16, n. 6, p. 1031-1032, 2010.

COETZEE, J. F.; APLEY, M. D.; KOCAN, K. M.; RURANGIRWA, F. R.; VAN DONKERSGOED, J. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 61–73, 2005.

COETZEE, J. F.; SCHMIDT, P. L.; APLEY, M. D.; REINBOLD, J. B.; KOCAN, K. M. Comparison of the complement fixation test and competitive ELISA for serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infection in experimentally infected steers. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 68, n. 8, p. 872-878, 2007.

DAHMANI, M.; DAVOUST, B.; BENTERKI, M. S.; FENOLLAR, F.; RAOULT, D.; MEDIANNIKOV, O. Development of a new PCR-based assay to detect *Anaplasmataceae* and the first report of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma platys* in cattle from Algeria. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 39, p. 39-45, 2015.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, New York, v. 9, n. 8, p. 772 -775, 2012.

DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; CABEZAS-CRUZ, A.; KOCAN, K. M. *Anaplasma phagocytophilum* Uses Common Strategies for Infection of Ticks and Vertebrate Hosts. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 24, n. 3, p. 173-180, 2016.

DE LA FUENTE, J.; 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, 2001.

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**, Wallingford, v. 6, n. 1, p. 75-89, 2005a.

DE LA FUENTE, J.; MASSUNG, R. F.; WONG, S. J.; CHU, F. K.; LUTZ, H.; MELI, M.; VON LOEWENICH, F. D.; GRZESZCZUK, A.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; MANGOLD, A. J.; NARANJO, V.; STUEN, S.; KOCAN, K. M. Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 3, p. 1309-1317, 2005b.

DE LA FUENTE, J.; RUYBAL, P.; MTSHALI, M. S.; NARANJO, V.; SHUQING, L.; MANGOLD, A. J. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.119, n.2-4, p.382–90, 2007.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; PRADO, T.; KOCAN, K. M. *Anaplasma marginale* *msp1* alpha genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.4, p. 1609–1616, 2003.

DE LA FUENTE, J.; VICENTE, J.; HOFLE, U.; RUIZ-FONS, E. R.; MERA, I. G. F.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; KOCAN, K. M.; GORTAZAR, C. *Anaplasma* infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla- La Mancha, Spain. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 100, p. 163-173, 2004.

DE MATOS, C.A. **Species composition and geographic distribution of ticks infesting cattle, goats and dogs in Maputo Province, Mozambique**. 2008. 130 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Faculty of Veterinary Science, University of Pretoria, 2008.

DRAZENOVICH, N.; FOLEY, J. E.; BROWN, R. N. Use of real-time quantitative PCR targeting the *msp2* protein gene to identify cryptic *Anaplasma phagocytophilum* infections in wildlife and domestic animals. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 6, p. 83-90, 2006.

DUGAT, T.; LAGRÉE, A. C.; MAILLARD, R.; BOULOUIS, H. J.; HADDAD, N. Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v.5: 61, p.1-18, 2015.

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

ECHAIDE, S. T.; KNOWLES, D. P.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H.; SUAREZ, C. E.; MCELWAIN, T. F. Detection of Cattle Naturally Infected with *Anaplasma marginale* in a Region of Endemicity by Nested PCR and a Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 3, p. 777-782, 1998.

ELELU, N.; FERROLHO, J.; COUTO, J.; DOMINGOS, A.; EISLER, M. C. Molecular diagnosis of the tick-borne pathogen *Anaplasma marginale* in cattle blood samples from Nigeria using qPCR. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam; New York, v. 70, n. 4, p. 501-510. 2016.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, n.3, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, New York, v.8, n.3, p.175-185, 1998.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lawrence, v.39, n.4, p.783-791, 1985.

FINE, A. B.; SWEENEY, J. D.; NIXON, C. P.; KNOLL, B. M. Transfusion-transmitted anaplasmosis from a leukoreduced platelet pool. **Transfusion**, Arlington, v. 56, n. 3, p. 699-704, 2016.

FOLEY, J. E.; HASTY, J. M.; LANE, R. S. Diversity of rickettsial pathogens in Columbian black-tailed deer and their associated keds (Diptera: Hippoboscidae) and ticks (Acari: Ixodidae). **Journal of Vector Ecology**, Hoboken, v.41, n. 1, p. 41-47, 2016.

FRANZÉN P.; BERG A. L.; ASPAN A.; GUNNARSSON A.; PRINGLE J. Death of a horse infected experimentally with *Anaplasma phagocytophilum*. **The Veterinary Record**, London, v. 160, n. 4, p. 122-125, 2007.

GLEZ-PEÑA, D.; GÓMEZ-BLANCO, D.; REBOIRO-JATO, M.; FDEZ-RIVEROLA, F.; POSADA, D. Alter: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. **Nucleic Acids Research**, London, v. 38, p. W14-W18, 2010.

GOETHERT, H. K.; TELFORD III, S. R. Enzootic transmission of *Anaplasma bovis* in Nantucket cottontail rabbits. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 8, p. 3744-3747, 2003.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, New York, v.8, n.3, p. 195-202, 1998.

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

GUO, W. P.; TIAN, J. H.; LIN, X. D.; NI, X. B.; CHEN, X. P.; LIAO, Y.; YANG, S. Y.; DUMLER, J. S.; HOLMES, E. C.; ZHANG, Y. Z. Extensive genetic diversity of Rickettsiales bacteria in multiple mosquito species. **Scientific reports**, London, v. 6, n. 38770, p. 1-11, 2016.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, London, n.41, p.95-98, 1999.

HARRUS, S.; PERLMAN-AVRAHAMI, A.; MUMCUOGLU, K. Y.; MORICK, D.; EYAL, O.; BANETH, G. Molecular detection of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma platys*, *Candidatus* Midichloria mitochondrii and *Babesia canis vogeli* in ticks from Israel. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 17, n. 3, p. 459-463, 2010.

HARVEY, J. W.; SIMPSON, C. F.; GASKIN, J. M. Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 137, n. 2, p. 182-188, 1978.

INOKUMA, H.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 11, p. 4219-4221, 2000.

KANG, Y. J.; DIAO, X. N.; ZHAO, G. Y.; CHEN, M. H.; XIONG, Y.; SHI, M.; FU, W. M.; GUO, Y. J.; PAN, B.; CHEN, X. P.; HOLMES, E. C.; GILLESPIE, J. J.; DUMLER, S. J.; ZHANG, Y. Z. Extensive diversity of Rickettsiales bacteria in two species of ticks from China and the evolution of the Rickettsiales. **BMC Evolutionary Biology**, London, v: 14:167, p.1-12, 2014.

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.

KIM, C. M.; YI, Y. H.; YU, D. H.; LEE, M. J.; CHO, M. R.; DESAI, A. R.; SHRINGI, S.; KLEIN, T. A.; KIM, H. C.; SONG, J. W.; BAEK, L. J.; CHONG, S. T.; O'GUINN, M. L.; LEE, J. S.; LEE, I. Y.; PARK, J. H.; FOLEY, J.; CHAE, J. S. Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 9, p. 5766-5776, 2006.

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.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; CABEZAS-CRUZ, A. The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, Paris, v. 34, n. 2, p. 577-586, 2015.

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

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 parasitemic to susceptible cattle. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 53, n. 4, 499-507, 1992.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LI, H.; ZHENG, Y. C.; MA, L.; JIA, N.; JIANG, B. G.; JIANG, R. R.; HUO, Q. B.; WANG, Y. W.; LIU, H. B.; CHU, Y. L.; SONG, Y. D.; YAO, N. N.; SUN, T.; ZENG, F. Y.; DUMLER, J. S.; JIANG, J. F.; CAO, W. C. Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: A surveillance study. **The Lancet. Infectious Diseases**, New York, v. 15, n. 6, p. 663-670, 2015.

LIMA, M. L.; SOARES, P. T.; RAMOS, C. A.; ARAUJO, F. R.; RAMOS, R. A.; SOUZA, I. I.; FAUSTINO, M. A.; ALVES, L. C. Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 2, p. 381-385, 2010.

LIU, Z.; MA, M.; WANG, Z.; WANG, J.; PENG, Y.; LI, Y. Molecular survey and genetic identification of *Anaplasma* species in goats from central and southern China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 2, p. 464-470, 2012.

LI, Y.; CHEN, Z.; LIU, Z.; LIU, J.; YANG, J.; LI, Q.; LI, Y.; LUO, J.; YIN, H. Molecular Survey of *Anaplasma* and *Ehrlichia* of Red Deer and Sika Deer in Gansu, China in 2013. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 63, n. 6, p. e228-e236, 2015a.

LI, Y.; YANG, J.; CHEN, Z.; QIN, G.; LI, Y.; LI, Q.; LIU, J.; LIU, Z.; GUAN, G.; YIN, H.; LUO, J.; ZHANG, L. *Anaplasma* infection of Bactrian camels (*Camelus bactrianus*) and ticks in Xinjiang, China. **Parasites & vectors**, London, v. 8, n. 313, p. 1-6, 2015b.

LOTTRIC-FURLAN, S.; PETROVEC, M.; ZUPANC, T. A.; NICHOLSON, W. L.; SUMNER, J. W.; CHILDS, J. E.; STRLE, F. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings for four patients from Slovenia. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, Chicago, v. 27, n. 3, 424-428, 1998.

MACHADO, R. Z.; DUARTE, J. M.; DAGNONE, A. S.; SZABÓ M. P. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocercus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, n.1-3, p. 262-266, 2006.

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.

MACHADO, R. Z.; TEIXEIRA, M. M. G.; RODRIGUES, A. C.; ANDRÉ, M. R.; GONÇALVES, L. R.; DA SILVA, J. B.; PEREIRA, C. L. Molecular diagnosis and genetic diversity of tick-borne Anaplasmataceae agentes infecting the African buffalo *Syncerus caffer* from Marromeu Reserve in Mozambique. **Parasites & vectors**, London, v. 9: 454, 2016.

MAGGI, R. G.; MASCARELLI, P. E.; HAVENGA, L. N.; NAIDOO, V.; BREITSCHWERDT, E. B. Coinfection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. **Parasites & vectors**, London, v. 6: 103, 2013.

MARTINS, T. M.; NEVES, L.; PEDRO, O. C.; FAFETINE, J. M.; DO ROSÁRIO, V. E.; DOMINGOS, A. Molecular detection of *Babesia* spp. and other haemoparasitic infections of cattle in Maputo Province, Mozambique. **Parasitology**, London, v.137, n. 6, p. 939-946, 2010.

MARTINS, T. M.; PEDRO, O. C.; CALDEIRA, R. A.; do ROSÁRIO, V. E.; NEVES, L.; DOMINGOS, A. Detection of bovine babesiosis in Mozambique by a novel seminested hot-start PCR method. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 153, n. 3-4, p. 225-230, 2008.

MASSUNG, R. F; SLATER, K. G. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 2, p. 717-722, 2003.

MASSUNG, R. F.; SLATER, K.; OWENS, J. H.; NICHOLSON, W. L.; MATHER, T. N.; SOLBERG, V. B.; OLSON, J. G. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.4, p.1090-1095, 1998.

MATSIMBE, A. M.; MAGAIA, V.; SANCHES, G. S.; NEVES, L.; NOORMAHOMED, E.; ANTUNES, S.; DOMINGOS, A. Molecular detection of pathogens in ticks infesting cattle in Nampula province, Mozambique. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 91-102, 2017.

MELTZER, M. I. A possible explanation of the apparent breed related resistance in cattle to bont tick (*Amblyomma hebraeum*) infestations. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 67, p. 275-279, 1996.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees". In: **Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, New Orleans, p.1-8, 2010.

MUNDERLOH, U. G.; TATE, C. M.; LYNCH, M. J.; HOWERTH, E. W.; KURTTI, T. J.; DAVISON, W. R.; Isolation of a *Anaplasma* sp. organism from white-tailed deer by tick cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 9, p. 4328-4335, 2003.

MUÑOZ-GUARNIZ, T. R.; AYORA-FERNÁNDEZ, P.; LUZURIAGA-NEIRA, A.; CORONA-GONZÁLEZ, B.; MARTÍNEZ-MARRERO, SIOMARA. Prevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos de la provincia Zamora Chinchipe, Ecuador. **Revista de Salud Animal**, La Habana, v.39, n.1, p. 68-74, 2017.

NICHOLSON, W. L.; CASTRO, M. B.; KRAMER, V. L.; SUMNER, J. W.; CHILDS, J. E. Dusky-Footed Wood Rats (*Neotoma fuscipes*) as Reservoirs of Granulocytic Ehrlichiae (*Rickettsiales: Ehrlichiae*) in Northern California. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 10, p. 3323–3327, 1999.

NORVAL, R. A. I. The effects of partial beak down of dipping in African areas in Rhodesia. **Rhodesian Veterinary Journal**, Salisbury, v. 9, p. 6-9, 1978.

OCHIRKHUU, N.; KONNAI, S.; ODBILEG, R.; MURATA, S.; OHASHI, K.; Molecular Epidemiological Survey and Genetic Characterization of *Anaplasma* Species in Mongolian Livestock. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 17, n. 8, p. 539-549, 2017.

OOSHIRO, M.; ZAKIMI, S.; MATSUKAWA, Y.; KATAGIRI, Y.; INOKUMA, H. Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* from cattle on Yonaguni Island, Okinawa, Japan. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 154, n. 3-4, p. 360-364, 2008.

PALMER, G. H.; ABBOTT, J. R.; FRENCH, D. M.; MCELWAIN, T. F. Persistence of *Anaplasma ovis* infection and conservation of the *msp-2* and *msp-3* multigene families within the genus *Anaplasma*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 12, p. 6035-6039, 1998.

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, p. 281–286, 1999.

PALOMAR, A. M.; PORTILLO, A.; SANTIBÁÑEZ, P.; MAZUELAS, D.; RONCERO, L.; GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; SANTIBÁÑEZ, S.; GUTIÉRREZ, Ó.; OTEO, J. A. Detection of tick-borne *Anaplasma bovis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma centrale* in Spain. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 349–353, 2015.

PAROLA, P.; CORNET, J. P.; SANOGO, Y. O.; MILLER, R. S.; THIEN, H. V.; GONZALEZ, J. P.; RAOULT, D.; TELFORD III, S. R.; WONGSRICHANALAI, C. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 4, p.1600-1608, 2003.

PICOLOTO, G.; LIMA, R. F.; OLEGÁRIO, L. A.; CARVALHO, C. M.; LACERDA, A. C.; TOMÁS, W. M.; BORGES, P. A.; PELLEGRIN, A. O.; MADRUGA, C. R. Real time polymerase chain reaction to diagnose *Anaplasma marginale* in cattle and deer (*Ozotoceros bezoarticus leucogaster*) of the Brazilian Pantanal. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 186-8, 2010.

POTHMANN, D.; POPPERT, S.; RAKOTOZANDRINDRAINNY, R.; HOGAN, B.; MASTROPAOLO, M.; THIEL, C.; SILAGHI, C. Prevalence and genetic characterization of *Anaplasma marginale* in zebu cattle (*Bos indicus*) and their ticks (*Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus microplus*) from Madagascar. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, Amsterdam, v. 7, n. 6, p. 1116-1123, 2016.

QUROLLO, B. A.; BALAKRISHNAN, N.; CANNON, C. Z.; MAGGI, R. G.; BREITSCHWERDT, E. B.; ZEGRE, C. Coinfection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae*, *Bartonella koehlerae* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in a cat diagnosed with splenic plasmacytosis and multiple myeloma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 16, n. 8, p. 713-720, 2014.

RENNEKER, S.; ABDO, J.; SALIH, D. E.; KARAGENÇ, T.; BILGIÇ, H.; TORINA, A.; OLIVA, A. G.; CAMPOS, J.; KULLMANN, B.; AHMED, J.; SEITZER, U. Can *Anaplasma ovis* in small ruminants be neglected any longer? **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlin, v. 60, n. 2, p. 105-112, 2013.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian Phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n.12, p. 1572-1574, 2003.

SACCHI, A. B.; DUARTE, J. M.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Exeter, v. 35, n.4, p.325-334, 2012.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SASHIKA, M.; ABE, G.; MATSUMOTO, K.; INOKUMA, H. Molecular survey of *Anaplasma* and *Ehrlichia* infections of feral raccoons (*Procyon lotor*) in Hokkaido, Japan. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 11, n. 4, p. 349-354, 2011.

SCHMIDT, H. A.; STRIMMER, K.; VINGRON, M.; von HAESELER, A. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. **Bioinformatics**, Oxford v. 18, n. 3, p. 502-504, 2002.

SCOLES, G. A.; BROCE, A. B.; LYSYK, T. J.; PALMER, G. H. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 668-675, 2005.

SHKAP, V.; MOLAD, T.; BRAYTON, K. A.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H. Expression of major surface protein 2 variants with conserved T-cell epitopes in *Anaplasma centrale* vaccines. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 2, p. 642-648, 2002.

SILAGHI, C.; SANTOS, A. S.; GOMES, J.; CHRISTOVA, I.; MATEI, I. A.; WALDER, G.; DOMINGOS, A.; BELL-SAKYI, L.; SPRONG, H.; VON LOEWENICH, F. D.; OTEO, J. A.; DE LA FUENTE, J.; DUMLER, J. S. Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma* spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 17, n. 1, p.12-22, 2017.

SILVEIRA, J. A.; RABELO, E. M.; LACERDA, A. C.; BORGES, P. A.; TOMÁS, W. M.; PELLEGRIN, A. O.; TOMICH, R. G.; RIBEIRO, M. F. Molecular detection and identification of hemoparasites in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) from the Pantanal Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, Amsterdam, v. 4, n.4, p. 341-345, 2013.

SILVEIRA, J. A.; RABELO, E. M.; RIBEIRO, M. F. Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). **Transboundary and emerging diseases**, Berlin, v. 59, n. 4, p. 353-60, 2012.

SIMPSON, R. M., GAUNT, S. D., HAIR, J. A., KOCAN, K. M., HENK, W. G., CASEY, H. W. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 52, n. 9, p. 1537-1541, 1991.

SIMUUNZA, M.; WEIRA, W.; COURCIERC, E.; TAITA, A.; SHIELS, B. Epidemiological analysis of tick-borne diseases in Zambia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 175, n. 3-4, p. 331-342, 2011.

SINGH, H.; JYOTI; HAQUE, M.; SINGH, N. K.; RATH, S. S. Molecular detection of *Anaplasma marginale* infection in carrier cattle. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 55-8, 2012.

SREEKUMAR, C.; ANANDAN, S.; BALASUNDARAM, S.; RAJAVELU, G. Morphology and staining characteristics of *Ehrlichia bovis*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v.19, n. 1, p. 79-83, 1996.

STOVER, B. C.; MULLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, London, v.11, n. 7, p. 1-9, 2010.

STUEN, S.; GRANQUIST, E. G.; SILAGHI, C. *Anaplasma phagocytophilum*: a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v.3, n. 31, p. 1-33, 2013.

SUMNER, J. W.; NICHOLSON, W. L.; MASSUNG, R. F. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of *Ehrlichia* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 8, p. 2087-2092, 1997.

TATE, C. M.; HOWERTH, E. W.; MEAD, D. G.; DUGAN, V. G.; LUTTRELL, M. P.; SAHORA, A. I.; MUNDERLOH, U. G.; DAVIDSON, W. R.; YABSLEY, M. J. *Anaplasma odocoilei* sp. nov. (family Anaplasmataceae) from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Ticks and Tick-Borne Diseases**, Amsterdam, v. 4, n.1-2, p. 110-119, 2013.

TEMBUE, A. A. M.; da SILVA, J. B.; da SILVA, F. J. M.; PIRES, M. S.; BALDANI, C. D.; SOARES, C. O.; MASSARD, C. L.; da FONSECA, A. H. Seroprevalence of IgG antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle from South Mozambique. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 318-324, 2011.

TEMBUE, A. A. S. M. **Hemoparasitos transmitidos por carrapatos e a percepção dos criadores sobre sua importância para bovinos na região Sul de Moçambique**. 2012. 198 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

TESHALE, S.; GEYSEN, D.; AMENI, G.; ASFAW, Y.; BERKVENS, D. Improved molecular detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species applied to *Amblyomma* ticks collected from cattle and sheep in Ethiopia. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2015.

THEILER, A. Gall sickness of South Africa (anaplasmosis of cattle). **The Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, London, v.16, p. 98–115, 1910.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRIFINOPOULOS, J.; NGUYEN, L. T.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 44, n. W1, p. W232-W235, 2016.

TROUT FRYXELL, R. T.; HENDRICKS, B. M.; POMPO, K.; MAYS, S. E.; PAULSEN, D. J.; OPERARIO, D. J.; HOUSTON, A. E. Investigating the Adult Ixodid Tick Populations and Their Associated *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* Bacteria at a Rocky Mountain Spotted Fever Hotspot in Western Tennessee. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v.17, n.8, p. 527-538, 2017.

UETI, M. W.; KNOWLES, D. P.; DAVITT, C. M.; SCOLES, G. A.; BASZLER, T. V.; PALMER, G. H. Quantitative differences in salivary pathogen load during tick transmission underlie strainspecific variation in transmission efficiency of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 77, n. 1, p. 70-75, 2009.

VARGAS-HERNANDEZ G.; ANDRÉ, M. R.; CENDALES, D. M.; SOUSA, K. C.; GONÇALVES, L. R.; RONDELLI, M. C.; MACHADO, R. Z.; TINUCCI-COSTA, M. Molecular detection of *Anaplasma* species in dogs in Colombia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 459-464, 2016.

VIDOTTO, M. C.; McGUIRE, T. C.; McELWAIN, T. F.; PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P. Jr. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 62, n. 7, p. 2940-2946, 1994.

VILLAR, M.; LÓPEZ, V.; AYLLÓN, N.; CABEZAS-CRUZ, A.; LÓPEZ, J. A.; VÁZQUEZ, J.; ALBERDI, P.; De LA FUENTE, J. The intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum* selectively manipulates the levels of vertebrate host proteins in the tick vector *Ixodes scapularis*. **Parasites & Vectors**, London, v. 9:467, p. 1-17, 2016.

WOLDEHIWET, Z. *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1078, n. 1, p. 446-460, 2006.

WOLDEHIWET, Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 167, n. 2-4, p. 108-122, 2010.

YANG, J.; HAN, R.; NIU, Q.; LIU, Z.; GUAN, G.; LIU, G.; LUO, J.; YIN, H. Occurrence of four *Anaplasma* species with veterinary and public health significance in sheep, northwestern China. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, Amsterdam, v. 9, n.1, p. 82-85, 2018.

YANG, J.; LI, Y.; LIU, Z.; GUAN, G.; CHEN, Z.; LUO, J.; WANG, X.; YIN, H. Molecular evidence for *Anaplasma bovis* Infection in Wild Reeves' Muntjac (*Muntiacus reevesi*), Southwest China. **Jornal of Wildlife Diseases**, Ames, v. 50, n.4, p. 982-985, 2014.

YBAÑEZ, A. P.; INOKUMA, H. *Anaplasma* species of veterinary importance in Japan. **Veterinary World**, Rajkot, v. 9, n. 11, p. 1190-1196, 2016

YBAÑEZ, A. P.; MATSUMOTO, K.; KISHIMOTO, T.; INOKUMA, H., Molecular analyses of a potentially novel *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* detected in sika deer (*Cervus nippon yessoensis*) in Japan. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.157, n. 1-2, p. 232–236, 2012.

YBAÑEZ, A. P.; SASHIKA, M.; INOKUMA, H. The phylogenetic position of *Anaplasma bovis* and inferences on the phylogeny of the genus *Anaplasma*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 76, n. 2, p. 307–312, 2014.

ZOBBA, R.; ANFOSSI, A. G.; PINNA, P. M. L.; DORE, G. M.; CHESSA, B.; SPEZZIGU, A.; ROCCA, S.; VISCO, S.; PITTAU, M.; ALBERTI, A. Molecular investigation and phylogeny of *Anaplasma* spp. in Mediterranean ruminants reveal the presence of neutrophil-tropic strains closely related to *A. platys*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, n. 1, p. 271-280, 2014.