

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/06/2019.

**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:

*Marcos R. André*

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

*Ana Patrícia Yatsuda Natsui*

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

*Rosângela Zacarias Machado*

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<sup>a</sup> 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 $\beta$*  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 $\beta$*  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
<b>Tabela 1.</b> Locais de colheita, raça dos animais amostrados e realização de controle de carrapatos por distritos de Maputo, Moçambique .....	20
<b>Tabela 2.</b> Descrição dos ensaios de qPCR para <i>Anaplasma marginale</i> e <i>Anaplasma phagocytophilum</i> baseados nos genes <i>msp1<math>\beta</math></i> e <i>msp2</i> , respectivamente, utilizados no presente estudo .....	24
<b>Tabela 3.</b> Descrição das sequências de oligonucleotídeos iniciadores e condições de ciclagem utilizados nos ensaios de PCR convencional para <i>Anaplasma</i> spp. ....	26
<b>Tabela 4.</b> Soroprevalência para <i>Anaplasma marginale</i> em bovinos amostrados em cinco distritos na cidade de Maputo, Moçambique .....	29
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros dos ensaios de qPCR para <i>Anaplasma marginale</i> ( <i>msp1<math>\beta</math></i> ) e <i>Anaplasma phagocytophilum</i> ( <i>msp2</i> ) .....	30
<b>Tabela 6.</b> Porcentagens de identidade (BLAST) das sequências do gene 16S rRNA de <i>Anaplasma</i> spp. obtidas pelo protocolo de Massung et al. (1998) .....	34
<b>Tabela 7.</b> Valores de sinal filogenético para os diferentes genes utilizados no estudo inferidos pelo software TreePuzzle .....	35
<b>Tabela 8.</b> 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
<b>Tabela 9.</b> Análise de haplótipos para os genes <i>msp4</i> e <i>msp5</i> de <i>Anaplasma marginale</i> .....	47
<b>Tabela 10.</b> 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
<b>Figura 1:</b> Inclusões de espécies de <i>Anaplasma</i> em suas respectivas células-alvo .....	12
<b>Figura 2.</b> 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
<b>Figura 3.</b> 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 <sup>7</sup> cópias/ μL a 2,0 x 10 <sup>0</sup> 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
<b>Figura 4.</b> 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 <sup>7</sup> cópias/ μL a 2,0 x 10 <sup>0</sup> 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
<b>Figura 5.</b> 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
<b>Figura 6.</b> 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 anaplasmoze 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 anaplasmoze granulocítica humana.

Em Moçambique a ocorrência de anaplasmoze 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 anaplasmoze 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.

## 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 (*msp1β*, *msp2*, 16S rRNA, *msp4*, *msp5* e *groEL*) evidenciaram a circulação de diferentes espécies de *Anaplasma* em bovinos amostrados em Moçambique: *A. marginale* (agente da anaplasnose bovina), *A. phagocytophilum* (agente da anaplasnose 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 strain-specific 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.