

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Anaplasma marginale* EM
BOVINOS DE CORTE NO PANTANAL BRASILEIRO**

Inalda Angélica de Souza Ramos

Médica Veterinária

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Anaplasma marginale* EM
BOVINOS DE CORTE NO PANTANAL BRASILEIRO**

Inalda Angélica de Souza Ramos

Orientador: Prof. Dr. Marcos Rogério André

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rosangela Zacarias Machado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área: Patologia veterinária

2018

R175d

Ramos, Inalda Angélica de Souza

Diversidade genética de *Anaplasma marginale* em bovinos de corte no Pantanal Brasileiro / Inalda Angélica de Souza Ramos. -- Jaboticabal, 2018

78 p. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Marcos Rogério André

Coorientadora: Rosangela Zacarias Machado

1. anaplasmoze bovina. 2. *Bos taurus indicus*. 3. msp1alfa. 4. msp4. 5. Brasil. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DIVERSIDADE GENÉTICA DO *Anaplasma marginale* EM BOVINOS DE CORTE NO PANTANAL BRASILEIRO

AUTORA: INALDA ANGELICA DE SOUZA RAMOS

ORIENTADOR: MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

COORIENTADORA: ROSANGELA ZACARIAS MACHADO


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:



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



Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE
Depto de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP / Jaboticabal



Profa. Dra. DARCI MORAES BARROS-BATTESTI
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV-UNESP / Câmpus de Jaboticabal



Prof. Dr. HEITOR MIRAGLIA HERRERA
Universidade Católica Dom Bosco / Pró-Reitoria Acadêmica / Campo Grande/MS



Pesquisadora Dra. ISABEL KINNEY FERREIRA DE MIRANDA SANTOS
FMRP/USP / Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 08 de novembro de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Inalda Angélica de Souza Ramos – Nascida na cidade de Jaboatão do Guararapes, Pernambuco, em 17 de junho de 1987. Formada em Medicina Veterinária (Bacharelado) pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Campus Recife, no ano de 2010. Durante o curso de graduação foi bolsista de monitorias e extensão entre os anos de 2005-2010, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Fez residência em clínica médica, clínica cirúrgica, laboratório clínico e anatomopatologia de ruminantes e equídeos, na Clínica de Bovinos de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco de 2011-2013, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Carla Lopes de Mendonça. Ingressou no curso de Mestrado em 2013, pelo Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da UFRPE, Campus Garanhuns, com bolsa da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEP), sob orientação da Prof^a. Dr^a. Carla Lopes de Mendonça, com trabalho intitulado “Avaliação da transmissão transplacentária de *Neospora caninum* em bovinos de leite na Região Agreste de Pernambuco”. Neste período participou do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) entre a Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Garanhuns (UFRPE/UAG) e Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP). Em março de 2015, ingressou no curso de doutorado pelo Programa de Pós - Graduação em Medicina Veterinária (Patologia Veterinária) da FCAV/UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André e coorientação da Prof^a. Dr^a. Rosangela Zacarias Machado, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICO

Aos meus pais, Antônio Ramos Neto e Maria Laudecí de Souza Ramos, a minha Irmã Andresa Priscila de Souza Ramos e ao meu marido Silvio Morais de Vasconcelos, por todo apoio, cuidado, compreensão e incentivo.

“Sede fortes e corajosos; não temais, nem vos atemorizeis diante deles; porque o Senhor vosso Deus é quem vai convosco. Não vos deixará, nem vos desampará” (Deuteronômio 31:6)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar foco, força de vontade, proteção e perseverança em todos esses anos.

À minha família: Antônio Ramos Neto, Maria Laudecí de Souza Ramos e Andresa Priscila de Souza Ramos pelo apoio emocional e financeiro.

Ao meu marido Silvio Morais de Vasconcelos pelo cuidado, apoio emocional e prestatividade.

Aos meus queridos amigos: Murilo da Cunha Leonardo, Renata Martins de Lima, Flávia Santos de Carvalho, Valéria Maria dos Santos e Thiago Arcoverde Maciel pelo carinho e incentivo.

À Clínica de Bovinos de Garanhuns (Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE), pela minha formação e aquisição de experiências em clínica de ruminantes, em especial à Dr^a. Carla Lopes de Mendonça e ao Dr. José Augusto Bastos Afonso da Silva.

Ao Prof. Dr. Marcos Rogério André (UNESP/FCAV) pela disponibilidade, ensinamentos em geral e por mostrar que devemos sempre tentar dar o nosso melhor em qualquer circunstância.

À Prof^a. Dr^a. Rosangela Zacarias Machado (UNESP/FCAV) por todas as oportunidades, confiança e por ser um exemplo de determinação.

Ao Prof. Dr. Heitor Miraglia Herrera (Universidade Católica Dom Bosco/UCDB, Campo Grande) pela prestatividade, disponibilidade, humildade, ajuda e por manter a união em equipe durante toda a realização das colheitas.

Aos colegas: João Bosco Vilela Campos, João Victor Alves e Gabriel Carvalho de Macedo (Universidade Católica Dom Bosco/UCDB, Campo Grande) pela ajuda e união em equipe durante as colheitas de sangue dos bovinos.

Aos proprietários das fazendas estudadas no Pantanal, MS, e tratadores por nos abrirem as portas e pela ajuda no manejo dos animais.

A todos os colegas do Laboratório de Imunoparasitologia Veterinária (UNESP/FCAV), em especial: Carlos Antônio Matos, Simone Fernandes de

Jesus, Otávio Luís Fidelis Júnior, Ana Claudia Calchi, Luís Ricardo Gonçalves, Natália Serra Mendes, Victória Valente Califre de Mello, Diego Carlos Zannatto, Thiago Merighi da Silva e Arvelino Jacinto pela ajuda e compartilhamento de conhecimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio-pesquisa (Processo 2015/14896-1) concedido ao Prof. Dr. Marcos Rogério André.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico CNPq (2014/401.403.120.16-5) concedido à Prof^a. Dr^a. Rosangela Zacarias Machado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

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

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 12375/15 do trabalho de pesquisa intitulado "**Diversidade genética do *Anaplasma marginale* em bovinos amostrados no Pantanal Sul Matogrossense**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Rogério André, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de julho de 2015.

Jaboticabal, 06 de julho de 2015.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Paola Castro Moraes'.

Profª Drª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUÇÃO.....	01
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Taxonomia de <i>A. marginale</i> e histórico.....	04
2.2. Ciclo biológico de <i>A. marginale</i>	05
2.3. Importância e epidemiologia de <i>A. marginale</i>	06
2.4. Susceptibilidade animal a <i>A. marginale</i>	09
2.5. Diversidade genética de <i>A. marginale</i>	10
III. OBJETIVOS.....	14
3.1. Objetivo geral.....	14
3.2. Objetivos específicos.....	14
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Área experimental e animais.....	15
4.2. Delineamento do estudo.....	16
4.3. Colheita de Amostras de Sangue.....	17
4.4. Volume globular.....	18
4.5. Avaliação de esfregaços sanguíneos corados.....	18
4.6. Ensaio Imunosorbente Enzimático Ligado à Enzima Indireto (iELISA).....	19
4.7. Extração de DNA.....	19
4.8. Reação de Amplificação para o gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (<i>gapdh</i>).....	20

4.9. PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>).....	21
4.10. PCR convencional (cPCR) para <i>A. marginale</i> baseada no gene <i>msp1α</i>	22
4.11. cPCR para <i>A. marginale</i> baseada no gene <i>msp4</i>	23
4.12. Eletroforese em gel de agarose.....	23
4.13. Purificação e sequenciamento dos produtos Reamplificados.....	23
4.14. Análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos de <i>msp1α</i> e <i>msp4</i> de <i>A. marginale</i>	24
4.15. Variação na sequência de aminoácidos da <i>msp1α</i> e <i>msp4</i> de <i>A. marginale</i>	24
4.16. Análise das sequências de DNA e classificação dos genótipos (gene <i>msp1α</i>).....	25
4.17. Diversidade de haplótipos.....	26
4.18. Análise de distância de nucleotídeos e polimorfismo do gene <i>msp4</i> de <i>A. marginale</i>	26
4. 19. Análise estatística.....	26
V. RESULTADOS.....	27
5.1. Volume globular e esfregaço sanguíneo.....	27
5.2. Frequência de anticorpos IgG anti- <i>A. marginale</i>	27
5.3. PCR convencional (cPCR) para o gene endógeno (<i>gapdh</i>).....	30
5.4. Frequência de animais positivos na qPCR para <i>A. marginale</i> baseada no gene <i>msp1β</i>	30
5.5. Análises baseadas no gene <i>msp1α</i> de <i>A. marginale</i>	35
5.5.1.1. Frequência de animais positivos na snPCR.....	35
5.5.1.2. Análise de identidade e divergência de nucleotídeos e entropia de aminoácidos.....	37
5.5.1.3. Diversidade genética de <i>A. marginale</i>	40
5.5.1.4. Análise do número de genótipos	50
5.5.2. Análises baseadas no gene <i>msp4</i> de <i>Anaplasma marginale</i>	50
5.5.2.1. Ensaio de cPCR para o gene <i>msp4</i> de <i>A. marginale</i>	50

5.5.2.2. Análise de identidade das sequências de nucleotídeos do gene <i>mSP4</i> de <i>A. marginale</i> pelo BLASTn.....	51
5.5.2.3. Valores de identidade e divergência entre sequências de nucleotídeos de <i>mSP4</i> de <i>A. marginale</i> detectada em bovinos de corte no Pantanal brasileiro pelo Bioedit.....	53
5.5.2.4. Matriz de identidade e divergência entre sequências do gene <i>mSP4</i> de <i>A. marginale</i> com as sequências obtidas na plataforma Blastn	54
5.5.2.5. Genótipos de <i>Anaplasma marginale</i> baseados no gene <i>mSP4</i>	57
5.5.2.6. Análise de entropia de aminoácidos para o gene <i>mSP4</i> de <i>A. marginale</i>	57
5.5.2.7. Análise de distância de nucleotídeos.....	58
VI. DISCUSSÃO.....	61
VII. CONCLUSÕES.....	66
VIII. REFERÊNCIAS.....	67

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Localização em coordenadas geográficas das propriedades estudadas e número (n) e categorias animais amostrada por propriedade no Pantanal brasileiro (agosto de 2016 e abril 2017)**16**
- Tabela 2.** Índices métricos de diversidade genética utilizados pelo programa *RepeatAnalyzer* para caracterização dos genótipos e estirpes de *A. marginale* circulantes em bovinos no Pantanal brasileiro.....**26**
- Tabela 3.** Frequência de bovinos de corte soropositivos para *A. marginale* do Pantanal brasileiro pelo iELISA, de acordo com a categoria animal estudada (Vaca/Bezerro) e propriedade de origem.....**29**
- Tabela 4.** Frequência de bovinos de corte positivos na qPCR para *A. marginale* baseada no gene *msp1 β* no Pantanal brasileiro, de acordo com a categoria animal estudada (Vaca/Bezerro) e propriedade de origem.....**33**
- Tabela 5.** Parâmetros dos ensaios de qPCR para *A. marginale* baseados no gene *msp1 β* a partir de amostras de sangue de 200 vacas e 200 bezerros amostrados no Pantanal brasileiro.....**34**
- Tabela 6.** Co-positividade e co-negatividade das amostras de sangue de bovinos de corte amostrados do Pantanal brasileiro nas técnicas sorológica (iELISA) e molecular (qPCR) utilizadas para diagnóstico de *A. marginale* segundo a categoria de animais (vacas/bezerros)**36**
- Tabela 7.** Matriz de identidade e divergência entre as 26 sequências de nucleotídeos do gene *msp1 α* de *A. marginale* detectadas em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro, comparativamente a amostras previamente depositadas no GenBank.....**38**
- Tabela 8.** Caracterização dos genótipos e estirpes das 26 amostras positivas para o gene *msp1 α* de *A. marginale*, com identificação dos animais, propriedade de origem e distribuição geográfica de acordo com o banco de dados do *RepeatAnalyzer*.....**42**

- Tabela 9.** Organização das oito novas estirpes de *msp1 α* de *A. marginale*, com seus genótipos, quantificação absoluta e identificação dos bovinos positivos da Fazenda A, Pantanal brasileiro.....**44**
- Tabela 10.** Índices métricos de diversidade genética do gene *msp1 α* de *A. marginale* encontrados em gado de corte no Pantanal brasileiro, comparado a outros estados brasileiros (São Paulo, Minas Gerais, Pará (búfalos), Rio de Janeiro e Goiás), bem como Brasil (geral) e mundo (geral), segundo o Software *RepeatAnalyzer*.....**47**
- Tabela 11.** Polimorfismo e diversidade genética de sequências *msp1 α* de *A. marginale* detectadas em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro.....**50**
- Tabela 12.** Amostras de vacas e bezerros (n=14) do Pantanal brasileiro positivas na cPCR para o gene *msp4* de *Anaplasma marginale* com identificação, valor de quantificação (qPCR baseada no gene *msp1 β*) e resultado do iELISA....**51**
- Tabela 13.** Máxima porcentagem de identidade obtida pelo BLASTn para sequências de *A. marginale* (gene *msp4*) detectadas em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro.....**52**
- Tabela 14.** Matriz de identidade e divergência entre sequências de nucleotídeos do gene *msp4* de *A. marginale* detectadas em bovinos de corte no Pantanal brasileiro.....**53**
- Tabela 15.** Matriz de identidade e divergência entre sequências de nucleotídeos de *msp4* de *Anaplasma marginale* detectadas em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro em comparação com sequências de outros países selecionadas via GenBank.....**56**
- Tabela 16.** Polimorfismo e diversidade genética de sequências *msp4* de *Anaplasma marginale* detectadas em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro.....**57**
- Tabela 17.** Polimorfismo e diversidade genética entre as sequências *msp4* de *Anaplasma marginale* detectadas em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro em conjunto com aquelas obtidas via GenBank.....**57**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Localização e divisão geográfica do Pantanal brasileiro no estado do Mato Grosso do Sul, com destaque para a área de estudo, sub-região da Nhecolândia (em verde). (Fonte: Programa Q-GIS v.2.8).....**15**
- Figura 2.** Organização do material para colheita de amostras de sangue **(A)**; colheita de sangue pela veia caudal dos animais **(B)**; bezerras Nelore (*Bos taurus indicus*) **(C)**; Organização dos animais para a entrada na seringa e brete de contenção (Pantanal – MS) **(D)**.....**18**
- Figura 3.** Placa de iELISA (Maxisorp®; Nunc, Thermo Scientific, Brasil). As amostras soropositivas para *A. marginale* apresentam mudança de coloração quando adicionado o conjugado anti-IgG bovino ligado à fosfatase alcalina (Sigma®, St. Louis, MO) na diluição de 1:30000. Leitura por espectrofotometria no leitor de ELISA (B.T. -100, Embrabio, São Paulo, Brasil).....**28**
- Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos a cPCR para controle endógeno (gene *gapdh*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA extraído de bovino); canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterilizada, Promega®); amostras positivas nas canaletas 3-15.....**30**
- Figura 5.** Curvas de amplificação **(A)** e curva-padrão **(B)** da qPCR para *A. marginale* baseada no gene *msp1β*. A figura **A** 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). A curva-padrão **(B)** 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 *msp1β* de *A. marginale* ($2,0 \times 10^7$ cópias/ μL a $2,0 \times 10^0$ cópias/ μL).....**32**
- Figura 6.** Entropia obtida a partir das sequências de aminoácidos de gene *msp1α* de *A. marginale* obtidas em amostras de sangue de bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro.....**39**

Figura 7. Distribuição mundial das 14 estirpes de *A. marginale* (gene *msp1α*) (τ -10-13-13-18; τ -27-18; EV8-EV8-17; α - β - β - β -100; EV7-11-10-15; τ -11-11-27-18; τ -11-10-15; α - β - β - β - Γ ; α - β - Γ ; 27-27; 42-25-31; τ -27-13-18; τ -22-2-13-18; τ -22-2-13) encontradas em bovinos de corte no Pantanal brasileiro. Seis estirpes (α - β - β - β - Γ ; α - β - Γ ; 27-27; τ -22-2-13-18; τ -22-2-13) também foram previamente relatadas em outras localidades do mundo, como 27-27 na China (AM3-27a), α - β - β - β - Γ na Argentina (Chaco) e México (Nayarit / Santiago), 42-25-31 em Madagascar (Sofia), τ -22-2-13-18 e τ -22-2-13 na Argentina (Chaco 2 var 1; Chaco3 var1; Chaco7; Chaco 8). Todos os resultados foram gerados no software *RepeatAnalyzer*.....45

Figura 8. Distribuição nacional das 14 estirpes de *A. marginale* (gene *msp1α*) (τ -10-13-13-18; τ -27-18; EV8-EV8-17; α - β - β - β -100; EV7-11-10-15; τ -11-11-27-18; τ -11-10-15; α - β - β - β - Γ ; α - β - Γ ; 27-27; 42-25-31; τ -27-13-18; τ -22-2-13-18; τ -22-2-13) encontradas em bovinos de corte no Pantanal brasileiro. Das estirpes encontradas, apenas duas foram relatadas anteriormente em solo brasileiro: 27-27 em Minas Gerais [(UFMG2), (Minas-5) e Minas Gerais (13,273)], α - β - β - β - Γ em São Paulo (Lins e Taiapu) e Goiás (Mambaí). Todos os resultados foram gerados no software *RepeatAnalyzer*.....46

Figura 9. Número de ocorrência de cada repetição em *tandem* encontrada no gene *msp1α* de estirpes de *A. marginale* em bovinos de corte no Pantanal brasileiro. A repetição **T** apresentou-se mais difundida (sete repetições) que as demais, seguida pela **18** (cinco repetições)48

Figura 10. Número de repetições em *tandem* do gene *msp1α* e seu tamanho (número de aminoácidos) encontradas em estirpes de *A. marginale* em bovinos de corte no Pantanal brasileiro. A maior parte das SSR apresentaram tamanho entre **28 e 30** aminoácidos.....49

Figura 11. Correlação entre o número de genótipos e o número de SSR encontradas em estirpes de *A. marginale* em bovinos de corte no Pantanal brasileiro. Cinco genótipos apresentaram três repetições e quatro genótipos cinco repetições.....49

- Figura 12.** Alinhamento de nucleotídeos das sequências *m*sp4 de *A. marginale* detectada em bovinos de corte no Pantanal brasileiro, com destaque para a área de mutação (T x G) na posição 316 da sequência MS2..54
- Figura 13.** Entropia de aminoácidos obtidas das sequências do gene *m*sp4 de *A. marginale* obtidas de amostras de sangue de bovinos do Pantanal brasileiro.....58
- Figura 14.** Análise de distância por meio do software *Splitstree* com os parâmetros “Neighbour-Net e “Uncorrected p-distance”. As sequências do gene *m*sp4 do Pantanal brasileiro formaram um clado com as sequências da Índia, Espanha, México, Argentina, China, Venezuela, Itália e MG (Brasil).....59
- Figura 15.** Rede de genótipos *m*sp4 de *A. marginale* detectados em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro em conjunto com aqueles obtidos via GenBank.....60

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Anaplasma marginale* EM BOVINOS DE CORTE NO PANTANAL BRASILEIRO

RESUMO - Poucos são os estudos acerca da diversidade genética de *Anaplasma marginale* nos rebanhos bovinos brasileiros, principalmente no que diz respeito a bovinos de corte. O presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética de *A. marginale*, com base nos genes *msp1 α* e *msp4*, em *Bos taurus indicus* amostrados no Pantanal brasileiro. Alíquotas de sangue com e sem EDTA foram colhidas de 400 bovinos (200 vacas e 200 bezerros) em cinco propriedades de cria e recria extensiva. Enquanto as amostras de soro foram submetidas ao Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA) para detecção de anticorpos IgG anti-*A. marginale*, amostras de sangue total foram submetidas à avaliação do hematócrito e confecção de esfregaços sanguíneos corados pelo Giemsa, PCR em tempo real quantitativa (qPCR) baseada no gene *msp1 β* , semi-nested (sn)PCR baseada no gene *msp1 α* e PCR convencional (cPCR) baseada no gene *msp4* para *A. marginale*. Os produtos amplificados nos ensaios de snPCR e cPCR foram purificados e sequenciados pelo Método de Sanger. Sequências do gene *msp1 α* foram submetidas à análise de diversidade pelo software *RepeatAnalyser*. Sequências do gene *msp4* foram submetidas à análise de distância *Network* pelo software *Splitstree* e de genótipos pelo Software *DnaSP5* e *PopART*. Cinco animais (duas vacas e três bezerros) apresentaram corpúsculos de *A. marginale* em esfregaços sanguíneos. As frequências de animais positivos pelo iELISA, qPCR e snPCR foram de 72,25% (289/400), 56,75% (227/400) e 22,9% (52/227), respectivamente. Os testes de iELISA e qPCR mostraram fraca concordância kappa. Vacas (154/200) mostraram-se estatisticamente mais soropositivas que bezerros (135/200) ($P < 0,05$). Na qPCR, o número de bezerros (138/200) e valor médio de quantificação ($1,3 \times 10^6$ cópias *msp1 α* *A. marginale*/ μ L) mostraram-se maiores quando comparados àqueles encontrados para as vacas (89/200; $3,9 \times 10^4$) ($P < 0,05$). A rickettsemia estimada pela qPCR não mostrou correlação com o hematócrito dos animais. A análise de microssatélites das 26 sequências *msp1 α* obtidas revelou a presença dos genótipos E (76,9%), C (15,38%) e B (7,69%). O software *RepeatAnalyser* mostrou a ocorrência de 14 estirpes circulantes na região sob estudo, com oito nunca antes descritas na literatura (τ -10-13-13-18; τ -27-18; EV8-EV8-17; α - β - β -100; EV7-11-10-15; τ -11-11-27-18; τ -11-10-15; τ -27-13-18). Alta diversidade genética de *A. marginale* foi encontrada em bovinos de corte no Pantanal Brasileiro. Os índices de diversidade genética revelaram alta diversidade entre o grupo de genótipos/estirpes analisados, bem como na região de colheita, indicando a circulação de novos genótipos/estirpes no país, porém com baixa taxa de dispersão. A cPCR para o gene *msp4* de *A. marginale* revelou 6,16% (14/227; 4 vacas e 10 bezerros) de positividade. Dois genótipos foram identificados entre as 14 sequências do presente estudo. Dezesesseis genótipos foram obtidos entre as sequências estudadas em conjunto com as obtidas no GenBank, mostrando que os genótipos *msp4* de *A. marginale* circulantes em bovinos de corte no Pantanal brasileiro são filogeograficamente relacionados àqueles circulantes em países das América do Sul e Central, Europa e Ásia.

Palavras-Chave: anaplasmoze bovina, *Bos taurus indicus*, *msp1 α* , *tandem repeats*, *msp4*, filogeografia, Brasil.

GENETIC DIVERSITY OF *Anaplasma marginale* IN BEEF CATTLE FROM BRAZILIAN PANTANAL

ABSTRACT – There are few studies about the genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Brazilian cattle herds, especially with regard to beef cattle. The present study aimed to evaluate the genetic diversity of *A. marginale* based on the *msp1 α* and *msp4* genes in *Bos taurus indicus*, sampled in the Brazilian Pantanal. Blood aliquots with and without EDTA were collected from 400 cattle (200 cows and 200 calves) in five extensive breeding and rearing properties. While the serum samples were submitted to the Indirect Immunoenzyme Assay (iELISA) for the detection of anti-*A. marginale* IgG antibodies, whole blood samples were submitted to the evaluation of hematocrit and Giemsa-stained blood smears, quantitative real-time PCR (qPCR) based on the *msp1 β* gene, semi-nested (sn) PCR based on the *msp1 α* gene and conventional PCR (cPCR) based on the *msp4* gene for *A. marginale*. The amplified products obtained in the snPCR and cPCR assays were purified and sequenced by the Sanger Method. Sequences of the *msp1 α* gene were submitted to diversity analysis by the *RepeatAnalyser* software. *msp4* gene sequences were submitted to *Network* distance analysis using the *Splitstree* software and genotypes analysis by the *DnaSP5* and *PopART* software. Five animals (two cows and three calves) presented *A. marginale* corpuscles in blood smears. The frequencies of iELISA positive animals, qPCR and snPCR were 72.25% (289/400), 56.75% (227/400) and 22.9% (52/227), respectively. The iELISA and qPCR tests showed weak kappa concordance. Cows (154/200) were statistically more seropositive than calves (135/200) ($P < 0.05$). In the qPCR, the number of calves (138/200) and mean value of quantification (1.3×10^6 copies *msp1 α* *A. marginale*/ μL) were higher when compared to those found for cows (89/200; 3.9×10^4) ($P < 0.05$). The rickettsemia estimated by qPCR showed no correlation with the hematocrit of the animals. Microsatellite analysis of the obtained 26 *msp1 α* sequences revealed the presence of E (76.9%), C (15.38%) and B (7.69%) genotypes. *RepeatAnalyzer* software showed the occurrence of 14 circulating strains in the studied region, with eight never previously described in the literature (τ -10-13-13-18; τ -27-18; EV8-EV8-17; α - β - β - β -100; EV7-11-10-15; τ -11-11-27-18; τ -11-10-15; τ -27-13-18). High genetic diversity of *A. marginale* was found in beef cattle in the Brazilian Pantanal. The genetic diversity indexes showed high diversity among the group of genotypes / strains analyzed, as well as in the studied region, indicating the circulation of new genotypes / strains in the country, but with low dispersion rate. The cPCR based on the *msp4* gene of *A. marginale* showed 6.16% (14/227, 4 cows and 10 calves) of positivity. Two genotypes were identified among the 14 sequences of the present study. Sixteen genotypes were obtained among the sequences found in the present study in conjunction with those obtained in *GenBank*, showing that *A. marginale msp4* genotypes circulating in beef cattle in the Brazilian Pantanal are phylogeographically related to those circulating in countries of South and Central América, Europe and Ásia.

Keywords: Bovine anaplasmosis, *Bos Taurus indicus*, Brazil, *msp1 α* , tandem repeats, phylogeography, Brazil.

INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil, que possui o segundo maior rebanho comercial do mundo, com mais de 209 milhões de cabeças, lidera o *ranking* de maior exportador de carne bovina mundial. Desde 2004, o país assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países. Seis estados brasileiros (Mato Grosso, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e Pará) contribuíram com mais de 62% do total de abates (MAPA, 2012). O Pantanal Sul Matogrossense possui quatro milhões de bovinos de corte criados de forma extensiva em pastagens nativas sujeitas a inundações periódicas, com importante papel na economia local e nacional (ABREU et al., 2008).

Anaplasma marginale é o agente Anaplasmataceae (Ordem Rickettsiales) intraeritrocitário patogênico de maior prevalência no mundo (KOCAN et al., 2003). Este hemoparasita possui grande capacidade de evasão à resposta imunológica do hospedeiro, resultando em animais cronicamente infectados (KOCAN et al., 2004; AUBRY; GEALE, 2011). Tais animais, embora não apresentem sinais clínicos, atuam como fontes de infecção para carrapatos e insetos hematófagos, vetores biológicos e mecânicos, respectivamente, e também na contaminação de fômites, resultando na transmissão do agente e na ocorrência de surtos da doença em áreas endêmicas (PALMER et al., 2009; LAURING; ANDINO, 2010). A transmissão transplacentária também mostra-se relevante, fazendo com que o agente se dissemine ao longo de gerações dentro do rebanho (SILVA et al., 2015).

Estima-se que as perdas geradas por esta enfermidade possam alcançar até 300 milhões de dólares/ano nos EUA, e aproximadamente 800 milhões de dólares na América Latina (KOCAN et al., 2003). Porém, para o Brasil tais prejuízos ainda não foram calculados (SOUZA et al., 2001).

Atualmente, os métodos de controle e prevenção de *A. marginale* apresentam limitações, uma vez que as vacinas desenvolvidas até o momento não mostram elevada eficácia. O tratamento com antibióticos, da mesma forma, não tem se mostrado eficaz em vários sistemas de criação, pois animais tratados podem apresentar recidiva da doença, além de representar um alto custo para o

produtor. Assim, ainda são necessários novos estudos para esclarecer os mecanismos envolvidos na resistência do agente e escape da resposta imune do hospedeiro (SILVA et al., 2015).

A membrana externa de *A. marginale* é capaz de induzir resposta imunológica por meio de proteínas de superfície (ARAUJO et al., 2003). Estudos baseados na análise das *tandem repeats* de *msp1 α* de *A. marginale*, objetivando conhecer a diversidade genética do parasita, já foram realizados em bovinos amostrados em alguns estados do Brasil, como São Paulo (MACHADO et al., 2015; SILVA et al., 2016), Minas Gerais (POOHL et al., 2013), Goiás (MACHADO et al., 2015), Paraná (VIDOTTO et al., 2006) e Rio de Janeiro (BAËTA et al., 2015; SILVA et al., 2015), comprovando a existência de diferentes estirpes do parasita circulantes nestes rebanhos. Ainda, estudos foram conduzidos acerca da diversidade genética das estirpes circulantes do referido parasita em búfalos nos estados do Pará (SILVA et al., 2014a) e Rio de Janeiro (SILVA et al., 2014b). Desta forma, estudos são necessários em outros estados brasileiros a fim de se conhecer a diversidade genética de *A. marginale* em nosso país. Enquanto a análise de *tandem repeats* da *msp1 α* permite o estudo da diversidade genética de *A. marginale*, a *msp4* demonstrou variação de sequência suficiente para apoiar a sua utilização em estudos filogeográficos (DE LA FUENTE et al., 2003).

O bioma Pantanal é a maior zona úmida de água doce do mundo, com uma área estimada de 138.183 km² (maior que Portugal ou a Bulgária), que ocupa áreas no Brasil, Paraguai e Bolívia (ALHO, 2005). A principal atividade econômica da região é a produção extensiva de gado de corte, com um rebanho estimado em quatro milhões (ABREU et al., 2008). O município pantaneiro de Corumbá possui o segundo maior efetivo de bovinos do Brasil, com 1,9 milhões de cabeças. Ainda, a região do Pantanal possui uma rica diversidade biológica com algumas espécies de carrapatos compartilhando animais selvagens e domésticos como hospedeiros (CAMPOS-PEREIRA et al., 2000; RAMOS et al., 2016). Na região pantaneira da Nhecolândia, município de Corumbá, bovinos foram encontrados parasitados por *R. microplus* (55,67 %), *Amblyomma sculptum* (38%) e *A. parvum* (4,1%) (RAMOS et al., 2016).

Assim, a pesquisa teve como objetivo identificar e caracterizar a diversidade genética de estirpes circulantes de *A. marginale* em bovinos naturalmente infectados, pertencentes a rebanhos de corte do Pantanal brasileiro.

Tal estudo, a longo prazo, contribuirá para o desenvolvimento de planos de controle contra este agente nesta região e, conseqüentemente, no Brasil. O conhecimento da variedade dessas estirpes circulantes no país auxiliará, no futuro, no desenvolvimento de vacinas e no entendimento dos mecanismos de escape à resposta imune deste patógeno.

II REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Taxonomia de *A. marginale* e histórico

Anaplasma marginale pertence à ordem Rickettsiales, reclassificada por Dumler et al. (2001), por meio de análises dos genes 16S rRNA, groESL e proteínas de superfície (MSPs) em duas famílias: Anaplasmataceae e Rickettsiaceae. A análise filogenética dos agentes Anaplasmataceae revelou quatro grupos geneticamente diferentes: (1) *Anaplasma* com 96,1% de similaridade, (2) *Ehrlichia* com 97,7%, (3) *Wolbachia* com 95,6% e (4) *Neorickettsia* com 94,9%. Estes microrganismos são parasitas intracelulares obrigatórios, encontrados exclusivamente dentro de vacúolos ligados à membrana citoplasmática da célula do hospedeiro vertebrado ou invertebrado. O gênero *Anaplasma*, até então, albergava as espécies *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis*, sendo estes patógenos específicos de ruminantes. Com a reclassificação, foram incluídas ao gênero as espécies: *A. platys* (anteriormente *E. platys*), *A. bovis* (anteriormente *E. bovis*), e *A. phagocytophilum*, que uniu os agentes *E. phagocytophila*, *E. equi* e o agente da HGE (Erlíquiose Granulocítica Humana).

Recentemente novas espécies foram propostas: *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.

Smith e Kilborne (1883) relataram que carrapatos eram vetores da enfermidade conhecida como "Febre do Texas no gado bovino, observando "pontos marginais" nos eritrócitos de animais com anemia. Concluíram assim, que seriam fases evolutivas do ciclo das babesias. Posteriormente, Theiler (1910, 1911), estudando bovinos anêmicos na África do Sul, classificou a babesiose e a anaplasmosose como doenças diferentes que podem coexistir em um mesmo animal. Posteriormente, *A. marginale* passou a ser detectado em outros países nas regiões tropical, subtropical e temperada, sendo também descrito infectando outras espécies de ruminantes, tais como como búfalo d'água (*Bubalus bubalis*),

búfalo Africano (*Syncerus caffer*), bison americano (*Bison bison*), veado-mula (*Odocoileus hemionus hemionus*), veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), veado-de-cauda-negra (*Odocoileus hemionus columbianus*), alce-da montanha (*Cervus elaphus nelsoni*), cervos-do-Pantanal (*Blastocercus dichotomus*) e cabras (*Capra aegagrus hircus*) (ZAUNGG et al., 1996; MACHADO et al., 2006; KOCAN et al., 2010; MACHADO et al., 2017; SILVA et al., 2018).

No Brasil, o primeiro estudo relacionado à diversidade genética de *A. marginale* com base na análise de *tandem repeats* do gene *msp1α* foi desenvolvido em gado de leite no estado do Paraná por Vidotto et al. (1995). Em seguida, estudos da mesma natureza foram desenvolvidos com amostras de *A. marginale* detectadas em gado de leite nos estados de Minas Gerais (Poohl et al., 2013), São Paulo (Machado et al., 2015; Silva et al., 2016) e Goiás (Machado et al., 2015). Silva et al. (2014a, 2014b) investigaram a diversidade genética do referido patógeno em búfalos na Ilha do Marajó e no Rio de Janeiro.

2.2. Ciclo biológico de *A. marginale*

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

Nos bovinos, o período de incubação varia de 7 a 60 dias, sendo em média 28 dias, onde a dose infectante é determinante para essa variação temporal (KOCAN et al., 2010). Uma vez no sangue do animal, o organismo penetra no eritrócito, invaginando a membrana celular de modo a formar um vacúolo, dividindo-se e formando um corpúsculo de inclusão contendo até oito corpúsculos iniciais. Após a infecção, o número de eritrócitos infectados aumenta geometricamente. Eritrócitos infectados são posteriormente fagocitados pelas células do sistema fagócito mononuclear (SFM), resultando no desenvolvimento de anemia leve a grave e icterícia, sem hemoglobinemia ou hemoglobinúria. Os sinais clínicos incluem febre, perda de peso, aborto, letargia e, muitas vezes, óbito (RISTIC, 1977). Os bovinos que sobrevivem à infecção aguda desenvolvem infecções crônicas caracterizadas por rickettsemia cíclica de baixo nível (KIESER et al., 1990).

Apesar da importância dos anticorpos na resposta imune contra *A. marginale*, é improvável que, isoladamente, esses sejam capazes de proteger os bovinos contra o agente. Dessa forma, torna-se evidente a importância da resposta celular, a qual envolve a participação de linfócitos T auxiliares (CD4+), produtores de interferon- γ (IFN- γ). O IFN- γ ativa macrófagos, aumentando a produção de óxido nítrico (NO), substância que tem ação tóxica sobre o patógeno (BROWN et al., 1998; BROWN et al., 2001b). Além disso, IFN- γ atua sobre linfócitos B, estimulando a produção de IgG2 (ESTES et al., 1994). Esse isótipo de imunoglobulina apresenta maior capacidade de promover fagocitose por meio de opsonização do que a IgG1 (MCGUIRE et al., 1979), estando provavelmente envolvido no processo de neutralização e infectividade dos corpúsculos iniciais de *A. marginale* mediada por anticorpos (TUO et al., 2002).

2.3. Importância e epidemiologia de *A. marginale*

O Brasil é considerado região endêmica para *A. marginale*. A prevalência deste patógeno estimada por métodos sorológicos (iELISA) em ruminantes domésticos no território brasileiro pode variar de 16,3% no semiárido sergipano (OLIVEIRA et al., 1992) até valores próximos a 100% nos estados de Minas Gerais, Paraíba, Bahia, Paraná, Pará, Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás (RIBEIRO; REIS, 1981; MADRUGA et al., 1994; ARAÚJO et al., 1995; VIDOTTO et al., 1995; SOUZA et al., 2001; ANDRADE et al., 2004; SILVA et al., 2014a; SILVA et al., 2014b; SILVA et al., 2015; MACHADO et al., 2015; SILVA et al.,

2016). Já a prevalência estimada por estudos moleculares (PCR) pode variar de 7,5% para búfalos na Ilha do Marajó (Pará) até valores próximos ou igual a 100%, como encontrado em bovinos de Taiaçu-SP (POOHL et al., 2013; SILVA et al., 2014a; SILVA et al., 2014b; SILVA et al., 2015; MACHADO et al., 2015; SILVA et al., 2016).

A anaplasmose bovina provoca impacto econômico nos países endêmicos, principalmente devido à alta morbidade e mortalidade em rebanhos suscetíveis. As perdas são decorrentes do baixo ganho de peso, redução da produção de leite, abortamento, gastos com tratamento e mortalidade (KOCAN et al., 2003). Nos Estados Unidos, onde a anaplasmose ocorre na forma de surtos de casos agudo e superagudos da doença, as perdas anuais em bovinos de corte resultantes da morbidade e mortalidade são estimadas em US\$ 300 milhões. Já na América Latina, onde a anaplasmose ocorre predominantemente na forma crônica e ocasionalmente aguda, essas perdas foram estimadas em US\$ 875 milhões (KOCAN et al., 2003).

A relação entre a população de vetores com a anaplasmose bovina gera três situações epidemiológicas distintas: a primeira é observada nas regiões onde há uma flutuação sazonal na população de vetores, que pode ser devida as condições climáticas ou pode ser provocada por estratégias inadequadas no controle de ectoparasitas (ARAÚJO et al., 2003). Neste caso, os animais estão sem contato com o patógeno por um longo período e, ao serem expostos, apresentam sintomatologia clínica aguda, com altas taxas de mortalidade (RIBEIRO et al., 1984; OLIVEIRA et al., 1992). A segunda situação ocorre em áreas onde a população de vetores está presente durante o ano todo, sendo os animais mais resistentes à infecção por desenvolverem imunidade nos primeiros meses de vida, ao serem infectados por *A. marginale* quando ainda estão protegidos pelos anticorpos colostrais. Nesta situação epidemiológica não são esperados surtos, nem altas taxas de mortalidade em animais adultos (RIBEIRO; REIS, 1981; ARAÚJO et al., 2003). A terceira situação ocorre em áreas marginais, onde as condições climáticas não são totalmente favoráveis ao desenvolvimento do carrapato, porém possibilitam a ocorrência de infestações temporárias em população de risco (ARAÚJO et al., 2003).

A transmissão de *A. marginale* pode ocorrer mecanicamente por moscas hematófagas ou fômites contaminados com sangue, biologicamente por

carrapatos e, menos comumente, por via transplacentária (PALMER et al., 2000; KOCAN et al., 2004; AUBRY; GEALE, 2011).

A transmissão mecânica pode ocorrer por fômites contaminados com sangue, incluindo agulhas, serras de descornas, pinças de nariz, instrumentos de tatuagem, dispositivos para brincos auriculares e instrumentos de castração (KOCAN et al., 2010). A transmissão mecânica por artrópodes tem sido relatada em dípteros hematófagos, principalmente dos gêneros *Tabanus* spp. e *Stomoxys* sp. A transmissão mecânica pode ser a rota principal de infecção dos bovinos por *A. marginale* em determinadas áreas dos Estados Unidos, América Central, América do Sul e África onde vetores carrapatos estão ausentes (EWING, 1981).

Já a transmissão biológica é efetuada por cerca de 20 espécies de carrapatos, sendo as principais pertencentes aos gêneros *Dermacentor* sp. em áreas temperadas e *Rhipicephalus* spp. nos trópicos (KOCAN et al., 2004). As estirpes de *A. marginale* naturalmente transmitidas por *R. microplus* em áreas tropicais são geneticamente distintas das estirpes comumente transmitidas por *Dermacentor andersoni* em regiões temperadas (FUTSE et al., 2003; SCOLES et al., 2007). A transmissão biológica deste agente pode ocorrer de duas formas distintas, transestadial (a partir de um estágio para outro) e intraestadial (dentro da mesma fase) (KOCAN et al., 1992a, 1992b). A transmissão transestadial de *A. marginale* foi demonstrada em carrapatos de três hospedeiros (*D. andersoni* e *D. variabilis*) nos Estados Unidos e África do Sul (*Rhipicephalus (Boophilus) simus*), e carrapatos de um hospedeiro (*Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*) em Israel, América Central e México (KOCAN et al., 2003). A transmissão intraestadial é realizada por carrapatos adultos machos quando se deslocam de um hospedeiro para outro. Assim, os carrapatos machos podem desempenhar um papel importante na transmissão biológica de *A. marginale*, pois são cronicamente infectados com o patógeno e podem transmitir o agente repetidamente por se deslocarem de um animal a outro e terem um período de vida superior aos das fêmeas (KOCAN et al., 1992a, 1992b).

Estudos já relataram a ocorrência de transmissão transplacentária de *A. marginale* no Brasil (GRAU et al., 2013; POOHL et al., 2013; SILVA et al., 2015). A transmissão transplacentária pode ocorrer quando vacas desenvolvem anaplasmose aguda durante a gestação ou em condições de constantes reinfecções em áreas endêmicas, podendo contribuir para a epidemiologia desta

doença em algumas regiões (POTGIETER; VANRENSBURG, 1987; KOCAN et al., 2003; SILVA et al., 2015).

2.4. Susceptibilidade animal a *A. marginale*

A primeira imunidade de bezerros recém-nascidos frente aos agentes infecciosos é fornecida por anticorpos colostrais, os quais constituem um importante fator para o estabelecimento do equilíbrio parasito-hospedeiro (POTGIETER; STOLTZ, 1994). Em áreas endêmicas, bezerros são infectados pela primeira vez durante os primeiros meses de vida, quando em geral, os animais encontram-se protegidos pelos anticorpos colostrais. A falha na transferência da imunidade passiva, ou mesmo o declínio natural dos anticorpos colostrais, associados às altas infestações por carrapatos e moscas, são fatores que devem ser considerados para a ocorrência de anaplasmosose neste período (MADRUGA et al., 1985; RIBEIRO et al., 2003). Herrero et al. (1998) mostraram que 79% dos bezerros apresentam anticorpos colostrais logo após o nascimento, diminuindo para 13% no primeiro mês de vida. Assim, quando as fêmeas gestantes são naturalmente expostas a *A. marginale* e não ocorrem falhas na passagem de anticorpos colostrais, os bezerros tornam-se imunes durante os primeiros dias de vida. Porém, a exposição dos bezerros à baixa carga do patógeno neste período é fundamental, pois propiciará o desenvolvimento de imunidade ativa sem a ocorrência de doença clínica.

Os indivíduos que sobrevivem à fase aguda permanecem cronicamente infectados, o que é fundamental para a transmissão contínua do agente no rebanho, visto que não ocorre transmissão transovariana no carrapato. A habilidade de *A. marginale* em causar infecção crônica é propiciada pela capacidade de variação antigênica das proteínas de membrana externa, escapando assim do sistema imune do hospedeiro. A manutenção de uma população de carrapatos infectados é dependente de um reservatório animal infectado (PALMER et al., 1999). Assim, a infecção dos carrapatos pela alimentação em animais cronicamente infectados parece ser relativamente eficiente, onde mais de 50% dos carrapatos tornam-se infectados após a alimentação (ERIKS et al., 1993).

A infecção de eritrócitos maduros por *A. marginale* elimina a possibilidade de que a persistência da infecção seja unicamente devido à proteção contra a

resposta imune na célula hospedeira, pois a vida média dos eritrócitos de bovinos de 160 dias implica na emergência contínua e reinfeção de novas hemácias para manter a infecção. Assim, a infecção crônica deve ser um processo dinâmico caracterizado pela contínua invasão de eritrócitos e replicação (PALMER et al., 2000). A identificação de ciclos repetidos de riquettsemias, cada um com aumento progressivo de organismos, seguido de uma diminuição abrupta, levou à hipótese de que a cronicidade da infecção reflete o surgimento sequencial e o controle imune de variantes antigênicas (KIESER et al., 1990). A eficácia da infecção de carrapatos e o desenvolvimento de níveis elevados de formas infectantes de *A. marginale* nas glândulas salivares, juntamente com a longevidade da riquettsemia, possuem um papel fundamental para a infecção crônica e transmissão contínua (PALMER et al., 2000).

2.5. Diversidade genética de *A. marginale*

Anaplasma marginale possui mais de 20 proteínas que induzem imunidade, sendo algumas capazes de realizar variação em sua estrutura molecular (KOCAN et al., 2010). Seis Proteínas Principais de Superfície (*MSPs*) foram identificadas para *A. marginale*, oriundas de eritrócitos bovinos e células de carrapatos infectados. Destas proteínas, enquanto *mSP4* e *mSP5* são expressas por genes individuais, e não variam antígenicamente dentre os isolados, *mSP1 α* , *mSP1 β* , *mSP2* e *mSP3* são expressas por famílias multigênicas e podem variar antígenicamente (KOCAN et al., 2003). A proteína *mSP1 α* é um heterodímero composto por *mSP1 α* (100kDa) e *mSP1 β* (105kDa). Estas proteínas são estruturalmente não relacionadas e ligadas de forma não-covalente (BARBET; ALLRED, 1991). A *mSP1 α* , expressa por um único gene polimórfico, é composta por uma região conservada e outra região variável contendo um número de unidades mutável de sequências repetidas (ALLRED et al., 1990). A *mSP1 β* é codificada por uma família multigênica que parecem recombinar, aumentando a antigenicidade do patógeno (BARBET; ALLRED, 1991).

A proteína *mSP4* é codificada por um único gene, tornando-a extremamente conservada. Entretanto, por mostrar variação suficiente em sua sequência, é utilizada em estudos filogeográficos (DE LA FUENTE et al., 2003; MOLAD et al., 2009). A análise das alterações dos códons e aminoácidos sobre a filogenia de *mSP4* evidenciou que a mesma não está sob pressão de seleção positiva (DE LA FUENTE et al., 2003). Sequências *mSP4* mostraram relações filogeográficas entre

isolados de *A. marginale* do México, Brasil, Argentina, Austrália e Índia, do gado mestiço, zebuíno e europeu, sugerindo processos evolutivos semelhantes entre estes isolados (DE LA FUENTE et al., 2004; MOLAD et al., 2009; GEORGE et al., 2017).

A proteína de superfície *msp1 α* , por sua vez, é uma adesina para eritrócitos e células do intestino de carrapatos, enquanto *msp1 β* mostra aderência apenas para eritrócitos de bovinos (MCGAREY; ALLRED, 1994; MCGAREY et al., 1994, DE LA FUENTE et al., 2001b, 2001c). A região variável da *msp1 α* contém epítomos para célula B altamente imunogênicos (PALMER et al., 2000; BLOUIN et al., 2002). Além disso, também contém epítomos de células Th₁ na região conservada, a qual também pode estar envolvida na imunoproteção (BROWN et al., 2001a). A *msp1 α* tem sido utilizada na identificação de estirpes geográficas de *A. marginale* por apresentar diferenças na massa molecular e sequência de aminoácidos (DE LA FUENTE et al., 2007). Baseado nesta classificação, a diversidade genética de *A. marginale* foi descrita em rebanhos bovinos na Europa (DE LA FUENTE et al., 2005a), África (MTSHALI et al., 2007; MUTSHEMBELE et al., 2014), Oriente Médio (MOLAD et al., 2009), América do Norte (PALMER et al., 2001; ALAMZAN et al., 2008), América do Sul (GARCIA-GARCIA et al., 2004; RUYBAL et al., 2009) e Ásia (YBAÑEZ et al., 2014). No Brasil, variações significativas nas sequências repetidas da *msp1 α* das estirpes de *A. marginale* foram observadas em bovinos dos estados do Paraná (VIDOTTO et al., 2006), Minas Gerais (POOHL et al., 2013), Rio de Janeiro (SILVA et al., 2015), Pará (SILVA et al., 2014a), São Paulo (MACHADO et al., 2015; SILVA et al., 2016) e Goiás (MACHADO et al., 2015).

As sequências repetidas da *msp1 α* de *A. marginale* posicionam-se dentro da região com maior mutabilidade, onde a posição dos aminoácidos é mais variável (DE LA FUENTE et al., 2001a; BOWIE et al., 2002). Enquanto as regiões antigênicas localizam-se em domínios intracelulares putativos, a parte da proteína exposta extracelularmente apresenta baixa antigenicidade. A baixa antigenicidade desta região da *msp1 α* , que afeta a adesão de *A. marginale* a receptores da célula hospedeira, pode representar um mecanismo envolvido na manutenção de infecções crônicas (DE LA FUENTE et al., 2001a; BOWIE et al., 2002). Assim, torna-se importante caracterizar as sequências repetidas da *msp1 α* de *A. marginale*, uma vez que essas parecem desempenhar funções importantes na

virulência deste agente na infecção de células hospedeiras em carrapatos, ou ainda, as repetições em série poderiam apresentar outras funções que ainda não foram descritas (ALLRED et al., 1990; DE LA FUENTE et al., 2001a; CABEZAS-CRUZ et al., 2013).

Recentemente, foi desenvolvida uma ferramenta de análises para as repetições de *msp1α* de *A. marginale*, que também fornece recursos de banco de dados, onde os genótipos são descritos de forma alfanumérica (HOVE et al., 2018). Neste sentido, Catanese et al. (2016) desenvolveram o software *RepeatAnalyzer*, a qual foi projetada para rastrear, gerenciar, analisar e catalogar sequências curtas repetidas (SSRs) e genótipos. A idéia do *RepeatAnalyzer* se originou de um programa muito simples para identificação de SSRs desenvolvido por Carter Hoffman (2015), e se ramificou para adicionar muitos novos recursos de análise. Atualmente, o *RepeatAnalyzer* mantém uma lista de todas as repetições e linhagens conhecidas de *A. marginale*, os locais onde foram relatadas e as fontes originais desses relatórios. Neste sentido, o software pode determinar quais repetições uma determinada sequências contém, e se o genótipo foi previamente relatado. Também é fornecido uma variedade de recursos de análise, incluindo: análise de diversidade genética para uma região geográfica específica; análise de genótipos para uma SSR, estirpe e localização especificada; e visualização de resultados de pesquisa em mapas geográficos. O *RepeatAnalyzer* foi desenvolvido usando *A. marginale* como organismo modelo, porém a ferramenta também pode ser usada no estudo de outras bactérias com loci SSR (CATANESE et al., 2016).

O *RepeatAnalyzer* calcula quatro métricas de diversidade genética, cada uma capturando a diversidade de repetições em uma região geográfica de uma maneira diferente. Tais métricas dividem-se em dois grupos: aquelas que mensuram a quantidade de repetições diferentes e aquelas que medem a distribuição dessas repetições. Com cada uma dessas categorias, há uma formulação global e local. A versão local de uma métrica calcula a pontuação de forma independente em cada genótipo e a média desses valores juntos para obter a pontuação final, enquanto a versão global examina todos os genótipos juntos. A métrica GDM1-L pode ser interpretada como o percentual de repetições únicas em cada genótipo na região, enquanto a pontuação GDM1-G é a porcentagem de repetições únicas em todos os genótipos da região. A GDM2-L pode ser

interpretada como a quantidade de variação (medida como desvio padrão) no número de ocorrências das repetições em um genótipo, enquanto a pontuação GDM2-G é a quantidade de variação no número de ocorrências de todas as repetições em todos os genótipos da região (CATANESE et al., 2016; ZAMANTUNGWA et al., 2016).

III OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente estudo objetivou avaliar, por meio de um estudo transversal, a diversidade genética de *Anaplasma marginale* em bovinos naturalmente infectados, pertencentes a rebanhos de corte no Pantanal brasileiro.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar a soroprevalência para *A. marginale* em bovinos de corte naturalmente infectados em propriedades localizadas no Pantanal brasileiro;
- Estimar a rickettsemia de *A. marginale* detectadas nos animais por meio da PCR em tempo real quantitativa absoluta (qPCR);
- Verificar a concordância entre os resultados obtidos pela qPCR e iELISA;
- Verificar a possível associação entre a rickettsemia de *A. marginale* estimada pela qPCR e o valor de hematócrito dos animais parasitados;
- Investigar a diversidade genética de *A. marginale* nos rebanhos estudados pela análise de *tandem repeats* de *msp1 α* ;
- Traçar inferência filogeográfica das estirpes de *A. marginale* com base no gene *msp4*;
- Investigar o número de haplótipos e entropia de sequências *msp4* e *msp1 α* de estirpes de *A. marginale* circulantes em bovinos de corte no Pantanal brasileiro.

IV MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área experimental e animais

Foram amostrados bovinos de corte (*Bos taurus indicus*) provenientes de cinco propriedades de cria e recria, mantidos em regime extensivo na Região Central do Pantanal brasileiro, Sub-região da Nhecolândia (18° 59' 15" S; 56° 37' 03") (**Figura 1**). As propriedades foram selecionadas por conveniência. A distância entre as propriedades amostradas variou de 30-50km.

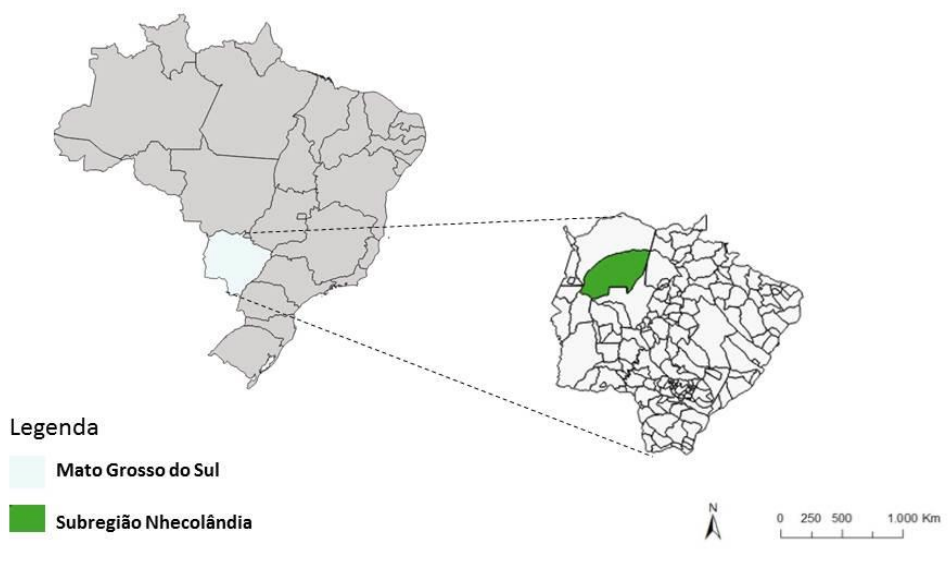


Figura 1. Localização e divisão geográfica do Pantanal brasileiro no estado do Mato Grosso do Sul, com destaque para a área de estudo, sub-região da Nhecolândia (em verde). (Fonte: Programa Q-GIS v.2.8).

Considerando a inexistência de dados a respeito da prevalência de *A. marginale* nesse estado, foi pressuposta uma prevalência esperada de 50%, conforme Stevenson (2008). O tamanho da amostra foi determinado através do método de amostragem aleatória sistemática, onde o número mínimo de animais teria precisão absoluta de 5% e intervalo de confiança de 95%. Dessa forma, foram colhidas amostras de sangue de 400 animais, das categorias: vaca (≥ 6 anos) e bezerros (7-12 meses) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Localização em coordenadas geográficas das propriedades estudadas e número (n) por categoria animal amostrados por propriedade no Pantanal brasileiro (agosto de 2016 e abril 2017).

Propriedade	Latitude	Longitude	Vacas (n)	Bezerros (n)	Total (n)
*Fazenda A	19° 08' 34" S	56° 47' 35"W	45	53	98
*Fazenda S	19° 16' 27" S	56° 38' 16" W	42	41	83
*Fazenda P	18° 54' 26" S	56° 31' 23" W	39	41	80
**Fazenda N	19° 15' 08" S	57° 03' 44" W	38	34	72
**Fazenda C	19° 09' 19" S	57° 50' 42" W	36	31	67
Total			200	200	400

*Primeira colheita (agosto/2016) **Segunda colheita (abril/2017)

4.2. Delineamento do estudo

Para a obtenção do número amostral de 400 animais, realizaram-se duas colheitas, sendo a primeira em agosto de 2016 e a segunda em abril de 2017, em um estudo transversal (aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal CONCEA e pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA, FCAV, UNESP, Protocolo nº n°12375/15).

Em todas as propriedades estudadas os animais eram mantidos em regime extensivo de cria e recria, com alimentação a base de duas espécies de gramíneas, o Capim-mimoso (*Axonopus purpusii*) e o Capim-mimosinho (*Reimarochloa brasiliensis*). Os bezerros eram apartados das suas mães com idade variando entre 8 e 12 meses, sendo posteriormente vendidos ou leiloados, para outras regiões do MS, SP e até para países adjacentes, como a Bolívia. As matrizes que mantinham bom estado de hígidez ao longo da criação sofriam descarte para abate com idade variando de 13-15 anos. Todos os animais estavam parasitados por carrapatos em diferentes intensidades. Lactonas macrocíclicas (avermectinas) injetáveis eram amplamente utilizadas para o controle de carrapatos (*Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma sculptum*). Moscas

hematófagas, como moscas-do-chifre (*Haematobia irritans*) e também mutucas (*Tabanus spp.*), foram observados em quase todas as propriedades. Materiais como agulhas e outros perfuro-cortantes eram reutilizados durante o manejo de vacinação e pequenas cirurgias, sem descontaminação ao passar de um animal para o outro. Enquanto as Fazendas A e S apresentaram suspeita clínica de anaplasmose em bezerros de 8 meses, a Fazenda P apresentou sinais clínicos de anaplasmose bovina em bezerros de 4-6 meses, porém sem confirmação laboratorial.

4.3. Colheita de Amostras de Sangue

Foram colhidas duas amostras de sangue diretamente da veia caudal ou jugular dos bovinos e, para a segurança da equipe, todo procedimento de colheita foi conduzido com os animais no brete de contenção. A organização do material de colheita, identificação dos animais e também dos tubos de colheita foi realizada em locais improvisados no campo. Objetos perfurantes, como agulhas foram descartados em locais apropriados, e o mesmo procedimento foi utilizado para luvas e materiais contaminados com sangue. Amostras de soro sanguíneo obtidas com tubos sem anticoagulante foram utilizadas para a realização do Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA). Amostras de sangue total colhidas em tubo com anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra – Acético Sódico 300 mmol/L.) foram utilizadas para a dosagem do volume globular, confecção de esfregaços sanguíneos e extração de DNA para posterior realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e quantificação absoluta da riquettsemia (qPCR) (**Figura 2**).



Figura 2. Organização do material para colheita de amostras de sangue **(A)**; colheita de sangue pela veia caudal dos animais **(B)**; bezerros Nelore (*Bos taurus indicus*) **(C)**; Organização dos animais para a entrada na seringa e brete de contenção (Pantanal – MS) **(D)**.

4.4. Volume globular

O volume globular dos animais amostrados foi determinado pela técnica de micro-hematócrito. Tubos capilares (micro-hematócrito) (Perfecta[®], Mooca, São Paulo) foram preenchidos com sangue, vedados com fogo e centrifugados a 10.000 rpm durante cinco minutos. Posteriormente, os valores foram determinados com o auxílio de uma escala própria para a técnica, considerando como não-anêmicos os bovinos com um volume globular entre 24% e 46%, e anêmicos aqueles que apresentaram volume globular inferior a 24% (DOUGLAS; WARDROP, 2010).

4.5. Avaliação de esfregaços sanguíneos corados

A busca por corpúsculos de *A. marginale* em eritrócitos foi realizada pela leitura de campos homogêneos de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa (May-Grunwald-Giemsa e Wright Giemsa) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, Estados Unidos) e previamente fixados com Metanol (Synth[®], São Paulo, SP), utilizando microscópio de luz (Olympus BX40) com objetiva de imersão (100X).

Foram avaliados no mínimo 40 campos (aproximadamente 200 células vermelhas por campo) (RIBEIRO; REIS, 1981).

4.6. Ensaio Imunosorbente Enzimático Ligado à Enzima 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 *A. marginale* utilizado foi produzido no Laboratório de Imunoparasitologia da FCAV/UNESP Jaboticabal, em uma concentração ótima 10 µg/mL, diluído em tampão carbonato bicarbonato 0,5M e pH 9,6. Após incubação por 12 horas a 4° C, realizou-se bloqueio com PBS Tween 20 (pH 7,2), adicionado de 6% de leite em pó desnatado (Molico[®], Nestlé, Brasil). As placas (Maxisorp[®]; Nunc, Thermo Scientific, Brasil) 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. As placas foram novamente incubadas à 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 (Sigma[®], St. Louis, EUA), 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, EUA), diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina pH 9,8 (Sigma[®], St. Louis, EUA). As placas foram seladas com papel alumínio e incubadas por 30 minutos à 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-negativo (MACHADO et al., 1997).

4.7. Extração de DNA

DNA das amostras de sangue total dos bovinos foi extraído a partir do protocolo descrito por Kuramae-Izioka (1997). Para tal, adicionaram-se 250 µL de cada amostra de sangue em microtubos DNase e RNase free (Kasvi[®], Abraão Calixto, Curitiba, Brasil). Em seguida, foram acrescentados 800 µL de tampão de lise, previamente aquecido em banho-maria a 65°C por 15 minutos, constituído de

160 mM de Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreídrico (Tris-HCl pH 8,0 60mM (Synth[®], Vila Mary, São Paulo, Brasil). 0,5M de ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) (Synth[®], Vila Mary, São Paulo, Brasil). 20 mM de cloreto de sódio (NaCl) (Synth[®], Vila Mary, São Paulo, Brasil). Dodecil sulfato de sódio (DSS) a 0,5% ((Merck[®], Darmstadt, Germany) polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma[®], St. Louis, MO, EUA) a 1% e β -mercaptoetanol a 0,2% (Sigma[®], St. Louis, MO, EUA), procedendo-se a incubação em banho-seco a 65°C por 40 minutos. O conteúdo do microtubo foi homogeneizado em agitador tipo vórtex por 15 segundos, a cada 20 minutos.

Em seguida, foram adicionados 300 μ L de acetato de potássio a 5M (Synth[®], Vila Mary, São Paulo, Brasil). Após esse procedimento, as amostras foram colocadas no gelo por 20 minutos, e depois centrifugadas por 10 minutos, a 10000 rpm por uma temperatura de 10°C. O sobrenadante foi coletado e acondicionado em novos microtubos. Posteriormente, foram acrescentados 600 μ L de clorofórmio (Merck[®], Darmstadt, Germany), álcool isoamílico (Acros Organics[®], New Jersey, USA) 24:1. As amostras foram novamente homogeneizadas por 20 segundos, seguidas por uma centrifugação a 10000 rpm a 10°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido, e novamente centrifugado por 10 minutos, a 10000 rpm e 10°C e em seguida foi recolhido em novo microtubo, sendo acrescentados 1000 μ L de álcool absoluto (Merck[®], Darmstadt, Germany) e armazenado a -20°C durante 12 horas. Passado esse período, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, nas mesmas condições já mencionadas. Foi realizado o descarte do sobrenadante e adicionados 800 μ L de álcool 70% (Merck[®], Darmstadt, Germany). As amostras foram novamente centrifugadas, sob as condições já descritas. O sobrenadante foi descartado e o material precipitado colocado para secar em estufa a 37°C por um período de aproximadamente 2 horas. Por fim, foram adicionados 50 μ L de TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,2; EDTA 1mM) para a eluição do DNA extraído.

As amostras de DNA foram devidamente identificadas e conduzidas para avaliação espectrofotométrica pelo NanoDrop (Thermo Scientific[®], San Jose, CA, Estados Unidos) da concentração do DNA extraído, bem como das relações 260/280 e 260/230, que indicam o grau de pureza do material obtido. As amostras de DNA foram armazenadas a uma temperatura de -20°C.

4.8. Reação de Amplificação para o gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*)

Para verificar a presença de inibidores nas amostras de DNA, foi realizado um ensaio de PCR para o gene endógeno *gapdh*, seguindo o protocolo estabelecido por Birkenheuer et al. (2003). A reação de amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25 µL, com uma mistura contendo 5 µL do DNA da amostra, 0,2 µM de cada deoxinucleotídeo, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Integrated DNA Technologies®, Cedar Rapids, EUA), 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 (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, EUA). A sequência térmica e de tempo de amplificação foi de: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos compostos por desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 5 minutos. Para tal, foi utilizado o par de primers GAPDH – F (5' -CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e GAPDH – R (5' -CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3') (BIRKENHEUER et al., 2003).

4.9. PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para *A. marginale* (gene *msp1β*)

As amostras positivas na PCR convencional baseada no gene *gapdh* foram submetidas a um ensaio de PCR em tempo real quantitativa (qPCR), segundo descrito por Carelli et al. (2007), com modificações para o gene *msp1β*. A reação teve volume total final de 10 µL, contendo uma mistura de 1 µL do DNA da amostra, 0,9 µM de cada oligonucleotídeo iniciador AM-F (5'-TTGGCAAGGCAGCAGCTT-3') e AM – R (5'-TTCCGCGAGCATGTTGCAT-3'), 0,2 µM da sonda de hidrólise AM – sonda (6FAM-5'-TCGGTCTAACATCTCCAGGCTTTCAT-3'-BHQ1) (Integrated DNA Technologies®, Cedar Rapids, EUA), 5 µL do tampão da PCR (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) e água ultrapura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, EUA) q.s.p. As reações de amplificação foram conduzidas com placas de PCR de padrão baixo do tipo “multiplate unskirted” (BioRad®, Hercules, Califórnia, EUA). Os ciclos foram realizados sob as seguintes condições: 95°C durante 10 minutos e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador CFX96 Thermal Cycler (BioRad®, Hercules, CA, EUA). Todas as amostras foram testadas em duplicatas. Para a quantificação do número de cópias de DNA-alvo/µL foi utilizado o plasmídeo

pSMART (Integrated DNA Technologies®, Coralville, Iowa, EUA) contendo a sequência alvo com 95 bp para amplificação do DNA de *A. marginale* (gene *msp1β*).

A eficiência da reação foi calculada por meio de diluições seriadas feitas a fim de construir uma curva padrão 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 ($\text{Xg}/\mu\text{L DNA} / [\text{tamanho do plasmídeo (pb)} \times 660] \times 6.022 \times 10^{23} \times \text{cópia do plasmídeo} / \mu\text{L}$). Como controle negativo da reação utilizou-se Água estéril ultra pura (ThermoFisher Scientific®, Carlsbad, California, EUA) e uma alíquota de DNA da amostra Jaboticabal de *A. marginale* serviu como controle positivo da reação.

4.10. PCR convencional (cPCR) para *A. marginale* baseada no gene *msp1α*

As amostras positivas na qPCR para o gene *msp1β* de *A. marginale* foram submetidas à semi-nested PCR para amplificação do fragmento do gene *msp1α* do referido agente, utilizando os protocolos descritos por De la Fuente et al. (2001) e Lew et al. (2002), com modificações. A primeira reação foi conduzida com um volume final de 25 μL de mistura, contendo 2,5 μL de DNA genômico, 12,5 μL de PCR Master Mix® (Qiagen®, Madison, EUA), 9 μL de água ultra pura esterilizada (Qiagen®, Madison, EUA) e 0,5 μM de concentração de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores 1733F- (5'-TGTGCTTATGGCAGACATTTCC-3') e 3134R1- (5'-TCACGGTCAAACCTTTGCTTACC-3') (Integrated DNA Technologies®, Cedar Rapids, EUA). Posteriormente, na segunda reação, foi utilizado um volume final de 25 μL de mistura, sendo 1 μL de DNA genômico amplificado na primeira reação, 12,5 μL de PCR Master Mix (Qiagen®, Madison, EUA), 10,5 μL de água ultra pura esterilizada (Qiagen®, Madison, EUA) e 0,5 μM de cada oligonucleotídeo iniciador 1733F- (5'-TGTGCTTATGGCAGACATTTCC-3') e 2957R2-(5'-AAACCTTGTAGCCCCAACTTATCC-3') (Integrated DNA Technologies®, Cedar Rapids, EUA).

As reações de amplificação foram conduzidas de acordo com sequência térmica: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 63°C por 1 minuto e 72°C a 2 minutos a, seguidos de uma extensão final a 72°C por 2 minutos. No segundo ciclo a sequência térmica de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30

segundos, 65°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, e extensão final de 72°C por 2 minutos.

4.11. cPCR para *A. marginale* baseada no gene *msp4*

As amostras positivas na qPCR para *A. marginale* baseada no gene *msp1a* também foram submetidas a PCR convencional baseada no gene *msp4*, utilizando o protocolo previamente descrito por De la Fuente et al. (2002). A reação foi conduzida com um volume final de 25 µL, contendo 5 µL de DNA genômico, tampão concentrado 10X, 0,75 mM de MgCl₂, 1,25 µM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores *msp45-* (5'-GGGAGCTCCTATGAATTACAGAGAATTGTTTAC-3') e *msp43-* (5'-CCGGATCCTTAGCTGAACAGGAATCTTGC-3') (Integrated DNA Technologies®, Cedar Rapids, EUA), 0,2 µM de deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP's), 0,1 U de Taq DNA Polimerase Platinum (ThermoFisher Scientific®, Carlsbad, California, EUA) e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, EUA) q.s.p. e. A sequência térmica utilizada foi com desnaturação inicial de 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.

4.12. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo (0,625 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 44 M ácido bórico; 12,49mM EDTA). O processo foi realizado a 100 V/350mA durante 50 minutos. Para a determinação do tamanho em pares de pb (pb) desses produtos foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific®, San Jose, CA, EUA). Os resultados foram visibilizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional de análise de imagens (ChemiDoc Imaging System, BioRad®, Hercules, Califórnia, EUA).

4.13. Purificação e sequenciamento dos produtos Reamplificados

Após a PCR, os produtos foram purificados com Sílica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific®, San Jose, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do material purificado foi realizada

em aparelho espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific®, San Jose, CA, EUA). O sequenciamento dos produtos amplificados e purificados foi feito por meio de sistema automatizado baseado no método de terminação da cadeia por dideoxynucleotídeo (SANGER et al., 1977). O processo foi conduzido em sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystem®, Foster City, CA, EUA), no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), utilizando os mesmos oligonucleotídeos empregados nos ensaios de cPCR para *A. marginale* baseados nos genes *msp1α* e *msp4*.

4.14. Análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos de *msp1α* e *msp4* de *A. marginale*

A trimagem foi feita pelo programa Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998), que avalia os eletroferogramas gerados nos sequenciamentos, observando a qualidade dos picos correspondentes a cada base sequenciada e conferindo um valor de probabilidade de erro a cada uma das amostras. Foram consideradas as bases com qualidade acima de 20. As sequências consenso também foram geradas pelo Phred/Phrap/Consed. O programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) foi utilizado para comparar a identidade das sequências de nucleotídeos obtidas com aquelas armazenadas em banco de dados internacionais (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) (BENSON et al., 2002).

A porcentagem de identidade entre as sequências de nucleotídeos dos genes *msp1α* e *msp4* de *A. marginale* obtidas no presente estudo também foi investigada a partir da ferramenta “Sequence identity matrix” no programa Bioedit v. 7.0.5.3. Já para verificar a variabilidade entre as sequências de aminoácidos foi realizada a análise de entropia. Para tal, as sequências de nucleotídeos dos referidos genes foram convertidas em aminoácidos com o auxílio da ferramenta de tradução ExPaSy [<http://web.expasy.org/translate/>] do Instituto Suíço de Bioinformática, alinhadas e em seguida submetidas à análise por meio da ferramenta “Entropy (H(x)) plot” via Bioedit v. 7.0.5.3 (THOMPSON et al., 1994; DE LA FUENTE et al., 2002).

4.15. Variação na sequência de aminoácidos da *msp1α* e *msp4* de *A. marginale*

A porcentagem de identidade entre as sequências de aminoácidos dos genes *msp1α* e *msp4* de *A. marginale* obtidas no presente estudo foi realizada a partir da ferramenta “Sequence identity matrix” no programa Bioedit v. 7.0.5.3. Para verificar a variabilidade entre as sequências de aminoácidos, foi feita a análise de entropia. Para tal, as sequências de nucleotídeos de *msp1α* e *msp4* foram convertidas em aminoácidos com o auxílio da ferramenta de tradução ExPaSy [<http://web.expasy.org/translate/>] do Instituto Suíço de Bioinformática, alinhadas e em seguida submetidas à análise por meio da ferramenta “Entropy (H(x)) plot” via Bioedit v. 7.0.5.3 (THOMPSON et al., 1994; DE LA FUENTE et al., 2002).

4.16. Análise das sequências de DNA e classificação dos genótipos (gene *msp1α*)

Para análise da diversidade genética foram incluídas neste estudo as amostras de *A. marginale* disponibilizadas no GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] que possuíam sequências de aminoácidos analisadas em *tandem* (CABEZAS-CRUZ et al., 2013). Um microssatélite foi localizado na *msp1α* entre a sequência putativa de Shine-Dalgarno (GTAGG) e o códon de iniciação da tradução (ATG) (DE LA FUENTE et al., 2001). A estrutura de microssatélites é determinada por GTAGG (G/A TTT) m (GT) n T ATG (ESTRADA-PEÑA et al., 2009). A análise dos genótipos foi realizada conforme a nomenclatura proposta por De la Fuente et al. (2007). A distância SD-ATG foi calculada segundo a fórmula $(4 \times m) \times (2 \times n) \times 1$, descrita por Estrada-Peña et al. (2009). Para o cálculo do genótipo e suas estirpes também foi utilizado o software RepeatAnalyzer, o qual vem sendo utilizado para identificar, armazenar, gerenciar e analisar *tandem repeats*. A diversidade genética foi calculada pelos índices métricos (**Tabela 2**) que mensuram a porcentagem de repetições únicas em uma região e também a regularidade com a qual as repetições são distribuídas. O programa também permitiu realizar o cálculo da frequência de cada repetição (SSRs) na região geográfica estudada (pelo número de genótipos) e listar o conjunto delas que são exclusivas para a região determinada, sendo as mesmas descritas alfanumericamente (CATANESE et al., 2016; HOVE et al., 2018).

Tabela 2. Índices métricos de diversidade genética utilizados pelo programa *RepeatAnalyzer* para caracterização dos genótipos e estirpes de *A. marginale* circulantes em bovinos no Pantanal brasileiro.

Índice	Significado
GDM1 E GDM2 (local)	Frequência de genótipos comparada entre eles e dispersão local.
GDM1 E GDM2 (global)	Frequência de genótipos comparada com outros já existentes e dispersão global.

Fonte: Catanese et al. (2016)

4.17. Diversidade de genótipos

O alinhamento das sequências dos genes *msp1α* e *msp4* obtidos no presente estudo foram utilizados para calcular a diversidade de nucleotídeos (π), nível de polimorfismo (diversidade de haplótipo – [dh]), número de haplótipos (h) e a média do número de diferenças nucleotídicas (K) utilizando o programa DnaSP v5 (LIBRADO; ROZAS, 2009).

4.18. Análise de distância de nucleotídeos e polimorfismo do gene *msp4* de *A. marginale*

Foi realizada a Análise de distância Network, utilizando o Software *Splitstree*, com os parâmetros *Neighbour-Net* e *Uncorrected p-distance*, das sequências *msp4* detectadas no presente estudo em conjunto com aquelas obtidas via *GenBank*, cujo polimorfismo foi avaliado pelo Software DnaSP5 (LIBRADO; ROZAS, 2009).

4.19. Análise estatística

Os resultados obtidos no iELISA e qPCR para as categorias vacas e bezerros, assim como a frequência de animais positivos por propriedade e foram analisados pelo teste Qui-Quadrado (χ^2). O valor médio de quantificação da rickettsemia estimada pelo qPCR foi analisada pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, utilizando-se o software The R Project for Statistical Computing (*R version 3.4.4*). Valores de $P < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos para uma das categorias ou propriedade estudadas. O índice de concordância geral entre os testes iELISA e qPCR foi estimado pelo Coeficiente

kappa (LANDIS E KOCH, 1977). A correlação entre a magnitude de rickettsemia estimada pela qPCR com o hematócrito foi avaliada pelo índice de correlação de Pearson (r).

V RESULTADOS

5.1. Volume globular e esfregaço sanguíneo

Enquanto o VG (%) das vacas variou de 22% a 50%, o de bezerros variou de 26% a 48%. Corpúsculos de *A. marginale* foram detectados nos esfregaços sanguíneo de cinco animais (2 vacas e 3 bezerros).

5.2. Frequência de anticorpos IgG anti- *A. marginale*

No teste iELISA para detecção de anticorpos IgG anti- *A. marginale*, 72,25% (289/400) das amostras mostraram-se positivas, com ponto de corte médio de 0,190. Dos 289 animais soropositivos, 53,28% (154/289) corresponderam a vacas e 46,71% (135/289) a bezerros. Na análise da frequência de soropositividade por categoria, as vacas apresentaram maior número de animais soropositivos (77%; 154/200) quando comparadas aos bezerros (67,5%; 135/200) ($P < 0,05$). Na análise geral, a taxa de soropositividade de bezerros não diferiu estatisticamente daquela de bezerras ($P \geq 0,05$) (dados não mostrados). Entre as cinco propriedades estudadas, a Fazenda A agrupou um maior número de bovinos soropositivos (94,9%; 93/98); quando comparada estatisticamente com a Fazenda C (92,5%; 62/67), não foi observada diferença significativa na frequência de soropositivos ($P \geq 0,05$). Similarmente, as taxas de soropositividade encontradas nas fazendas São José e Novo Horizonte também não diferiram estatisticamente ($P \geq 0,05$) (**Tabela 3**). A mudança de coloração das amostras reagentes (soropositivas) ao conjugado ligado a fosfatase alcalina pode ser vista na **Figura 3**.

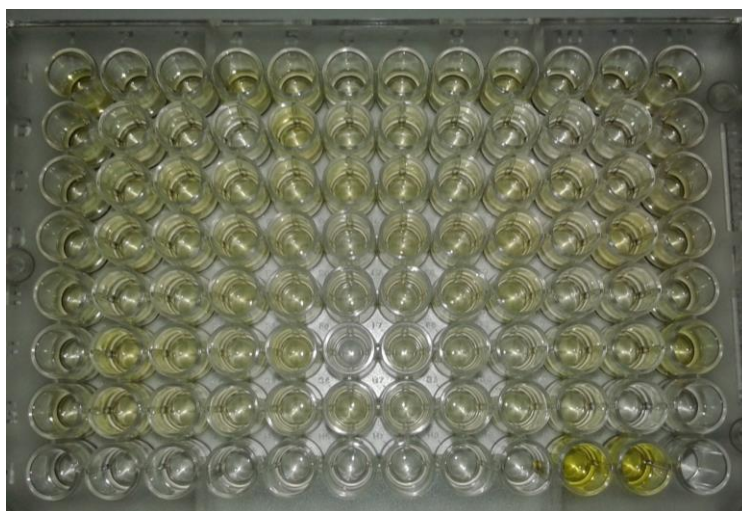


Figura 3. Placa de iELISA (Maxisorp®; Nunc, Thermo Scientific, Brasil). As amostras soropositivas para *A. marginale* apresentam mudança de coloração quando adicionado o conjugado anti-IgG bovino ligado à fosfatase alcalina (Sigma®, St. Louis, MO) na diluição de 1:30000. Leitura por espectrofotometria no leitor de ELISA (B.T. -100, Embrabio, São Paulo, Brasil).

Tabela 3. Frequência de bovinos de corte soropositivos para *A. marginale* do Pantanal brasileiro pelo iELISA, de acordo com a categoria animal estudada (Vaca/Bezerro) e propriedade de origem.

Propriedades	Vacas (n)***	%	Bezerros (n)***	%	Total	% Geral
Fazenda A	(44/45)	97,8%	(49/53)	92,4%	(93/98)	94,9%(A) **
Fazenda S	(35/42)	83,3%	(30/41)	73,2%	(65/83)	78,3%(B) **
Fazenda P	(13/39)	33,3%	(2/41)	4,9%	(15/80)	18,7%(C)
Fazenda N	(30/38)	78,9%	(24/34)	70,6%	(54/72)	75%(B) **
Fazenda C	(32/36)	88,9%	(30/31)	96,8%	(62/67)	92,5%(A) ** (B) **
Total	(154/200)	77%(a) *	(135/200)	67,50%(b) *	(289/400)	72,25%

*Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($P < 0,05$); **Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($P < 0,05$) *** (n) para número de animais positivos/número de animais amostrados por propriedade

5.3. PCR convencional (cPCR) para o gene endógeno (*gapdh*)

Todas as 400 amostras de DNA extraídas do sangue dos bovinos mostraram-se positivas na cPCR para o gene endógeno (*gapdh*). O ensaio foi realizado após a avaliação espectrofotométrica da concentração média e das relações de absorvância (260/280 e 260/230 nm) das amostras de DNA extraídas, as quais assumiram valores de 25,14 ng/μL, (DP ± 10,14), 1,8 nm (DP ± 0,12) e 1,33 nm (DP ± 0,56), respectivamente. Na **Figura 4** é possível observar a eletroforese em gel agarose a 1,0% da cPCR para o gene *gapdh* (fragmento de aproximadamente 450 pb).

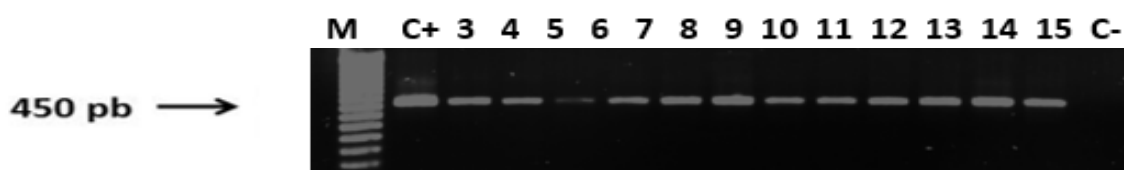


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo. Os amplímeros mostrados na foto são relativos a cPCR para controle endógeno (gene *gapdh*). Canaleta M: marcador de peso molecular em escala de 100 pares de bases (Life Technologies®); canaleta C+: controle positivo (DNA extraído de bovino); canaleta C-: controle negativo (água ultra-pura esterilizada, Promega®); amostras positivas nas canaletas 3-15.

5.4. Frequência de animais positivos na qPCR para *A. marginale* baseada no gene *msp1β*

Todas as 400 amostras de DNA extraídas do sangue dos bovinos mostraram-se positivas na cPCR para o gene endógeno (*gapdh*). Dentre estas, 56,75% (227/400) mostraram-se positivas na qPCR para *A. marginale* baseada no gene *msp1β*. Das 227 amostras positivas, 39,20% (89/227) corresponderam a vacas e 60,79% (138/227) a bezerros. Por categoria, o número de bezerros positivos (69%; 138/200) mostrou-se estatisticamente maior quando comparado aquele de vacas (44,5%; 89/200) ($P < 0,05$). Não houve diferença na frequência de positivos de acordo com o sexo dos bezerros ($P \geq 0,05$) (dados não mostrados). Entre as cinco propriedades estudadas, a Fazenda A apresentou um maior número de bovinos positivos (81,6%; 80/98) para *A. marginale* na qPCR ($P < 0,05$). A Fazenda S, Novo Horizonte e Cáceres não diferiram estatisticamente quanto ao número de animais positivos na qPCR ($P \geq 0,05$) (**Tabela 4**). A quantificação

média do número de cópias de um fragmento de 95pb do gene *msp1β* de *A. marginale* por μL de DNA foi de $3,9 \times 10^4$ ($\text{DP} \pm 5,26 \times 10^3$), com Cq médio de 32,60 ($\text{DP} \pm 0,73$) para as vacas. Já para bezerros, a média quantificação foi significativamente maior $1,3 \times 10^6$ ($\text{DP} \pm 6,73 \times 10^7$) ($P < 0,05$), com Cq médio de 30,27 ($\text{DP} \pm 1,7$). As duas vacas e os três bezerros que apresentaram corpúsculos de *A. marginale* no esfregaço sanguíneo, apresentaram o hematócrito dentro dos valores normais, variando de 28-45% e quantificação de $2,12 \times 10^3$ a $5,64 \times 10^5$, com maior valor para bezerros. A correlação entre a magnitude de rickettsemia estimada pela qPCR com o hematócrito, avaliada pelo índice de correlação de Pearson (r), foi de -0,0032, sendo considerada estatisticamente inexistente.

Todos os parâmetros dos ensaios de qPCR (eficiência, inclinação, coeficiente de determinação e y-intercepto) estão apresentados na **Tabela 5 e Figura 5 (A e B)** de acordo com o *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (MIQE) (BUSTIN et al., 2009). O índice kappa entre os testes iELISA e qPCR apresentou concordância de 0,14, sendo considerada como baixa.

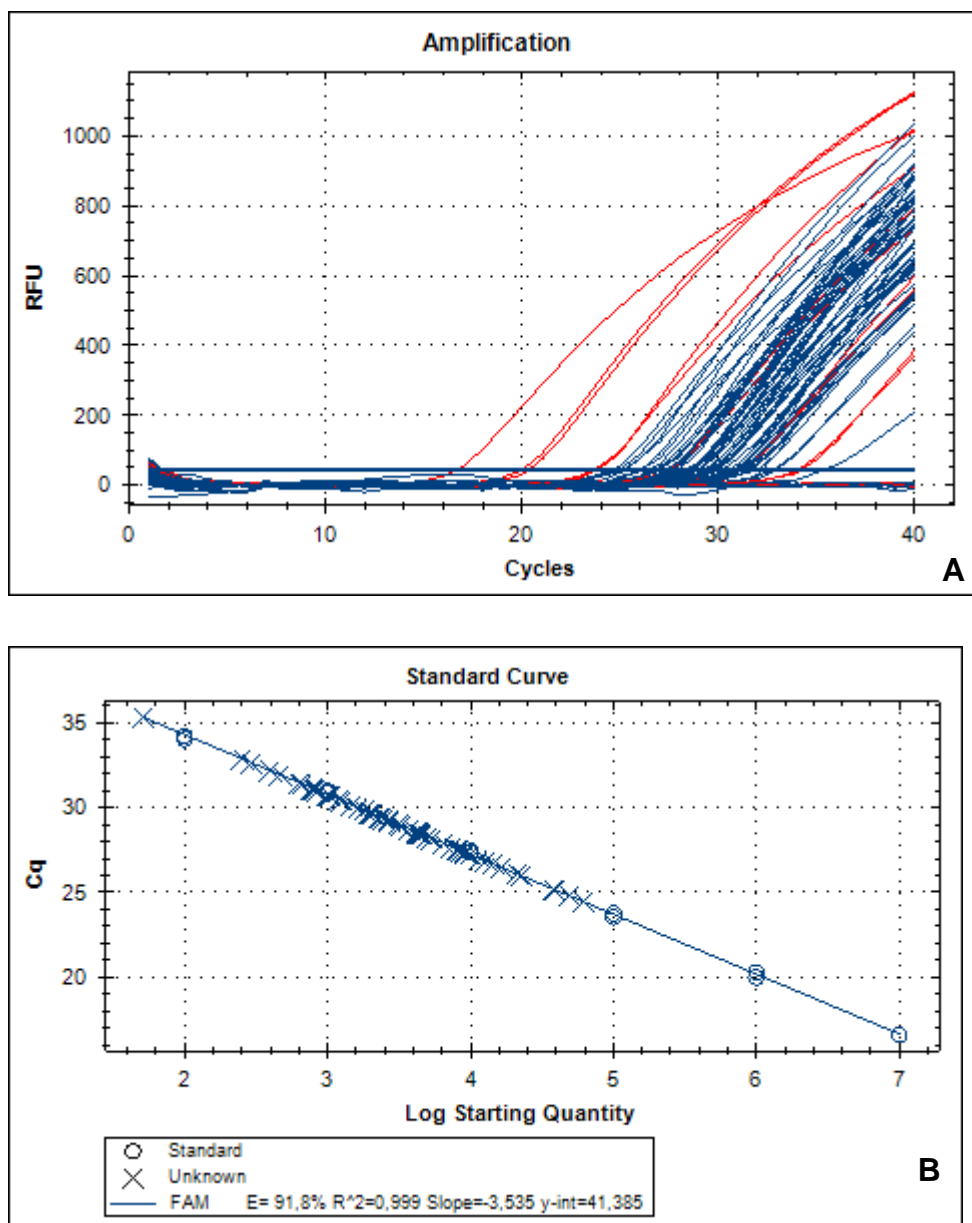


Figura 5. Curvas de amplificação **(A)** e padrão **(B)** da qPCR para *A. marginale* baseada no gene *msp1β*. A figura **A** apresenta os ciclos de amplificação das amostras-teste (em azul) e da diluição seriada de um plasmídeo contendo a sequência-alvo de *A. marginale* (em vermelho). A curva-padrão **(B)** 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 *msp1β* de *A. marginale* ($2,0 \times 10^7$ cópias/ μL a $2,0 \times 10^0$ cópias/ μL).

Tabela 4. Frequência de bovinos de corte positivos na qPCR para *A. marginale* baseada no gene *msp1β* no Pantanal brasileiro, de acordo com a categoria animal estudada (Vaca/Bezerro) e propriedade de origem.

Propriedades	Vacas (n) ^{***}	%	Bezerros (n) ^{***}	%	Total	% Geral
Fazenda A	(27/45)	60%	(53/53)	100%	(80/98)	81,6% ^(A)
Fazenda S	(15/42)	35,7%	(35/41)	85,3%	(50/83)	60,2% ^(B)
Fazenda P	(13/39)	33,3%	(1/41)	2,4%	(14/80)	17,5% ^(C)
Fazenda N	(17/38)	44,7%	(21/34)	61,7%	(38/72)	52,7% ^(B)
Fazenda C	(17/36)	47,2%	(28/31)	90,3%	(45/67)	67,1% ^(B)
Total	(89/200)	44,5%^(a)	(138/200)	69%^(b)	(227/400)	56,75%

*Letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($P < 0,05$); **Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($P < 0,05$) *** (n) para número de animais positivos/número de animais amostrados por propriedade

Tabela 5. Parâmetros dos ensaios de qPCR para *A. marginale* baseados no gene *msp1β* a partir de amostras de sangue de 200 vacas e 200 bezerros amostrados no Pantanal brasileiro.

<i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>) Vacas	E	R ²	Inclinação	Y-intercepto	Cq	SQ
<i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>) Bezerros	94,65	0,993	-3,461	41,277	32,60	3,9x10 ⁴
Média	101,8	0,999	-3,574	42,498	38,12	2,67x10 ⁷
Mínimo	90,5	0,975	-3,28	39,99	25,76	5,56x10 ²
	E	R ²	Inclinação	Y-intercepto	Cq	SQ
	91,62	0,9954	-3,5408	41,462	30,276	1,3x10 ⁶
Máximo	93,5	0,999	-3,565	41,862	37,002	4,39x10 ⁸
Mínimo	90,8	0,99	-3,489	41,183	24,862	2,45x10 ³

E: eficiência de amplificação; R²: coeficiente de determinação; Cq: ciclo de quantificação; SQ (Starting Quantity – Quantidade de DNA inicial: cópias de um fragmento de 95pb do gene *MSP1β* de *A. marginale* por μL de DNA).

5.5. Análises baseadas no gene *msp1 α* de *A. marginale*

5.5.1.1. Frequência de animais positivos na snPCR

Das 227 amostras que mostraram-se positivas para *A. marginale* na qPCR dirigida ao gene *msp1 β* , 22,9% (52/227) mostraram-se positivas na snPCR baseada no gene *msp1 α* , das quais 9,69% (22/227) correspondiam à categoria vacas e 13,21% à categoria bezerros (30/227). Com base na intensidade de bandas obtidas na eletroforese em gel de agarose, apenas 47,27% (26/52) amplicons obtidos de vacas (53,84%;14/26) e bezerros (46,15%;12/26) foram submetidos ao sequenciamento pelo método de Sanger. Na avaliação geral do total de amplicons do gene *msp1 α* de *A. marginale*, 92,3% (24/26) pertenciam a bovinos da Fazenda A, 3,85% (1/26) à Fazenda S e 3,85% (1/26) à Fazenda P. As frequências de positividade por categoria (vaca/bezerro) para *A. marginale* nos ensaios de iELISA e qPCR estão apresentadas na **(Tabela 6)**.

5.5.1.2. Análise de identidade e divergência de nucleotídeos e entropia de aminoácidos

A identidade e divergência nucleotídica entre as sequências do gene *msp1α* de *A. marginale* obtidas no presente estudo mostraram variação de 48% a 100% e 0% a 52%, respectivamente. A menor identidade (48%) e maior divergência (52%) das sequências colhidas no Pantanal (MS) foram encontradas na comparação entre #MS7 (MS9) e #MS9 (MS25). Já a maior identidade (100%) e menor divergência (0%) foram obtidas entre #MS1 (MS14; MS19), #MS4 (MS6), #MS5 (MS18; MS20; MS22), #MS7 (MS25), #MS11 (MS12), #MS13 (MS15), #MS14 (MS19), #MS17 (MS23), #MS18 (MS20; MS22) e #MS20 (MS22). Ao comparar as 26 amostras do estudo com 24 amostras do gene *msp1α* de *A. marginale* selecionadas no BLASTn e obtidas via GenBank (JX844209; JX844213; KC470183; KC470176; AY702926; KT121549; KC181903; DQ811778; JF957806; AY998121; KJ575598; KF005076; KJ575599; AY191826; KJ626206; DQ501244; AY702931; LINS7; LINS10; LINS16; LINS1453; GOIÁS1806; AY355284; AY010247), observou-se uma variação de identidade de 47% a 100%. A maior identidade (100%) e menor divergência (0%) foram observadas ao se comparar as amostras #MS4 e #MS6 com a KJ626206 (obtida de *Amblyomma cajennense* 1- Rio de Janeiro). Já a menor identidade (47%) e maior divergência (53%) foram observadas entre DQ811778 (Bovino- Texas EUA) e #MS9 (**Tabela 7**). Na análise de entropia de aminoácidos do gene *msp1α* de *A. marginale*, observaram-se 42 picos de alta entropia distribuídos ao longo do gráfico, com tamanho amplitude variando entre 0,16 e 1,49 (**Figura 6**).

Tabela 7. Matriz de identidade e divergência entre as 26 seqüências de nucleotídeos do gene *msp1α* de *A. marginale* detectadas em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro, comparativamente a amostras previamente depositadas no GenBank.

Table with 26 columns (MS1-MS26) and 26 rows (MS1-MS26) showing identity percentages. The diagonal is 100%. Other cells show identity percentages between samples, with some cells containing 'ID' or 'ID%' indicating high identity. The table is truncated at the bottom.

*(A-JX844209 B- JX844213 C- KC470183 D- KC470176 E- AY702926 F- KT121549 G-KC181903 H- DQ811778 I- JF957806 J- AY998121 K- KJ575598 L- KF005076 M- KJ575599 N- AY191826 O- KJ626206 P- DQ501244 Q- AY702931 R-LINS7 S- LINS10 T- LINS16 U- LINS1453 V- GOIÁS1806 W- AY355284 X- AY010247).

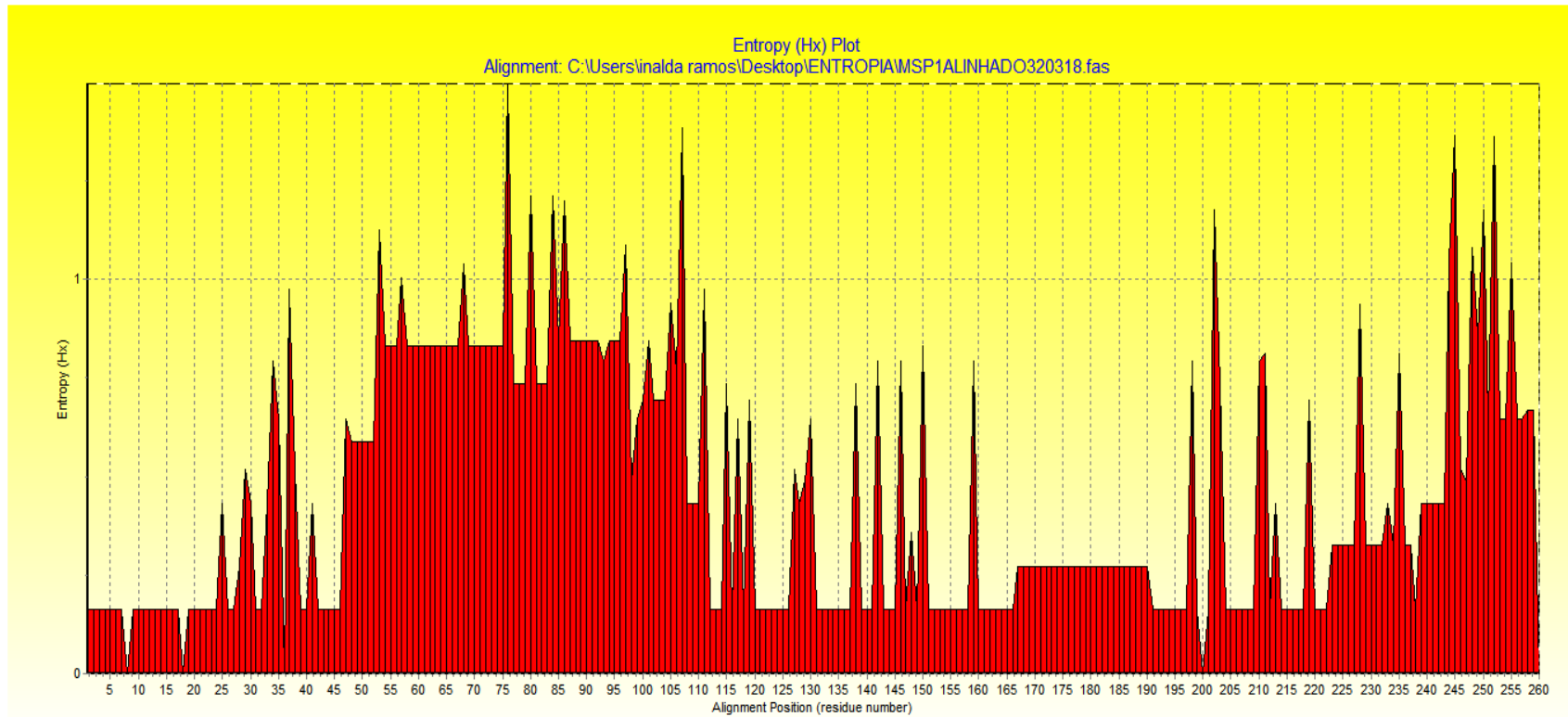


Figura 6. Entropia obtida a partir das seqüências de aminoácidos de gene *msp1 α* de *A. marginale* obtidas em amostras de sangue de bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro.

5.5.1.3. Diversidade genética de *A. marginale*

Utilizando o software *RepeatAnalyzer* para a classificação genotípica alfanumérica e identificação de estirpes, foram encontradas 14 estirpes, com seis já relatadas na literatura (α - β - β - β - Γ ; α - β - Γ ; 27-27; 42-25-31; τ -22-2-13-18; τ -22-2-13) e oito nunca antes descritas (τ -10-13-13-18; τ -27-18; EV8-EV8-17; α - β - β - β -100; EV7-11-10-15; τ -11-11-27-18; τ -11-10-15; τ -27-13-18). Na Fazenda S, uma vaca (MS14) estava infectada com a estirpe τ -22-2-13-18 de genótipo E. Na Fazenda A, uma vaca (MS1) estava infectada com a estirpe τ -22-2-13 e genótipo E. Ambas as estirpes citadas anteriormente foram previamente descritas na Argentina (Chaco).

Uma vaca (MS9) e um bezerro (MS15) da Fazenda A estavam infectados com a estirpe 27-27 e genótipo E, assim como uma vaca (MS13) pertencente à Fazenda P. Relatos anteriores dessa estirpe foram encontrados na China e no Estado de Minas Gerais, Brasil.

A estirpe 42-25-31 foi detectada em uma vaca da Fazenda A (MS10) e previamente em bovinos de Madagascar (Sofia). Na Fazenda A, uma vaca (MS5) e quatro bezerros (MS18; MS19; MS21; MS23) estavam infectados com a estirpe α - β - β - β - Γ , a qual foi previamente relatada na Argentina (Santa Fé), México (Nayrit Santiago e Jalisco Tapalta) e nos estados brasileiros de São Paulo (Lins e Taiapu) e Goiás (Mambaí). Os cinco animais acima discriminados estavam infectados com o genótipo E, com exceção do bezerro MS23, o qual apresentou o genótipo C. Um bezerro da Fazenda A (MS26) mostrou-se infectado pela estirpe α - β - Γ com genótipo E, já relatada na Argentina (Chaco) e México (Nayarit Santiago). Os dados sobre a caracterização geral das estirpes e genótipos encontrados em bovinos nas cinco propriedades do Pantanal brasileiro encontram-se na **Tabela 8**.

As oito novas estirpes (τ -10-13-13-18; τ -27-18; EV8-EV8-17; α - β - β - β -100; EV7-11-10-15; τ -11-11-27-18; τ -11-10-15; τ -27-13-18) foram detectadas em bovinos da Fazenda A. Duas vacas (vaca 31 – MS1 / vaca 20 – MS12) estavam infectadas com a estirpe EV7-11-10-15 de genótipo E. Outra nova estirpe, a τ -10-13-13-18, infectou o maior número de animais (n=3) da propriedade (bezerro 10 - MS20 / vaca 8 - MS2/ vaca 10 - MS3), compreendendo ao genótipo C. A estirpe τ -27-18 de genótipo E foi encontrada em duas vacas (vaca 24 - MS6 / vaca 13 - MS4). Uma vaca e um bezerro (vaca 26 – MS7 / bezerro 22 - MS24),

apresentaram a estirpe **EV8-EV8-17** de genótipo **E**. Uma vaca (vaca 32 - MS8) apresentou a estirpe **α - β - β - β -100** de genótipo **E**. Dois bezerros (bezerro 3 - MS17 / bezerro 18 - MS22) apresentaram a estirpe **τ -11-11-27-18** de genótipo **B**. Um bezerro (bezerro 23 - MS25) apresentou a estirpe **τ -11-10-15** de genótipo **E**; outro bezerro (bezerro 2 - MS16), por sua vez, mostrou-se infectado com a estirpe **τ -27-13-18** de genótipo **E**. A distribuição das novas estirpes descritas neste estudo, bem como detalhes sobre o valor da riquettsemia, podem ser visibilizados na **Tabela 9**. Mapas elaborados no Software *RepeatAnalyser* indicando a distribuição de todos os genótipos e estirpes encontrados neste estudo, a nível mundial e nacional podem ser observados nas **Figuras 7 e 8**.

Os índice métricos de diversidade genética, GDM1- local^a (0,854) e GDM1-Global^a (0,339), obtidos no Pantanal brasileiro revelaram alto valor, indicando que as repetições (SSRs) foram bem diversas entre si e também na região estudada. Os índices GDM2-Local^a (0,051) e GDM2-Global^a (0,037) revelaram baixo valor, mostrando que as SSRs se apresentaram em quantidades aproximadas, ou seja, ocorreram aproximadamente o mesmo número de vezes e que a distribuição na região sob estudo foi uniforme. Os valores mostraram-se baixos para ambas as métricas do GDM2, indicando que as SSRs são pouco dispersas. Comparando com estudos conduzidos em outros estados brasileiros com bovinos de leite em São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Goiás e búfalos no Pará, o índice GDM1 também apresentou valores próximos ou igual a (1) (Paraná), indicando que a maioria das SSRs não são iguais e, desta forma, a presença de uma alta diversidade. A distribuição das repetições nesses estados brasileiros também se mostrou uniforme, uma vez que GDM2 apresentou valor mais próximo de zero. Esse resultado foi similar quando comparado de forma geral (Brasil e mundo). Os índices mostraram estirpes diferentes em cada região e pouco disseminadas (**Tabela 10**).

Tabela 8. Caracterização dos genótipos e estirpes das 26 amostras positivas para o gene *msp1a* de *A. marginale*, com identificação dos animais, propriedade de origem e distribuição geográfica de acordo com o banco de dados do *RepeatAnalyzer*.

Número da amostra	Identificação	Propriedade	Genótipo (ESTRADA PEÑA et al., 2009)	Genótipo/estirpe (CATANESE et al., 2016)	Distribuição das estirpes (Brasil/mundo)
MS1	Vaca 3	Fazenda A	E	τ 22-2 13	Argentina (Chaco 2 var 1; Chaco3 var1; Chaco7; Chaco 8); Brasil, Mato Grosso do Sul
MS2	Vaca 8	Fazenda A	C	τ 10 13 13 18	Brasil, Mato Grosso do Sul
MS3	Vaca 10	Fazenda A	C	τ 10 13 13 18	Brasil, Mato Grosso do Sul
MS4	Vaca 13	Fazenda A	E	τ 27 18	Brasil, Mato Grosso do Sul
MS5	Vaca 22	Fazenda A	E	α β β β Γ	Argentina (Santa fé 37,43,50,59) / México, Nayarit, Santiago Ixcuintla/ México, Jalisco Tapalpa/ Brasil, São Paulo/Brasil, Goiás/ Brasil, Mato Grosso do Sul
MS6	Vaca 24	Fazenda A	E	τ 27 18	Brasil, Mato Grosso do Sul
MS7	Vaca 26	Fazenda A	E	EV8 EV8 17	Brasil, Mato Grosso do Sul
MS8	Vaca 32	Fazenda A	E	α β β β 100	Brasil, Mato Grosso do Sul
MS9	Vaca 33	Fazenda A	E	27 27	China (AM3-27a); Brasil, Minas Gerais (UFMG2); Minas Gerais (Minas-5); Minas Gerais (13,273); Brasil, Mato Grosso do Sul
MS10	Vaca 37	Fazenda A	E	42 25 31	Madagascar, Sofia; Brasil, Mato Grosso do Sul
MS11	Vaca 31	Fazenda A	E	EV7 11 10 15	Brasil, Mato Grosso do Sul
MS12	Vaca 20	Fazenda A	E	EV7 11 10 15	Brasil, Mato Grosso do Sul
MS13	V126	Fazenda P	E	27 27	China (AM3-27a); Brasil, Minas Gerais (UFMG2); Minas Gerais (Minas-5); Minas Gerais (13,273); Brasil, Mato Grosso do Sul
MS14	V94	Fazenda S	E	τ 22-2 13 18	Argentina (Chaco 2 var 1; Chaco3 var1; Chaco7; Chaco 8)); Brasil, Mato Grosso do Sul
MS15	B1	Fazenda A	E	27 27	China (AM3-27a); Brasil, Minas Gerais (UFMG2); Minas Gerais (Minas-5); Minas

Gerais (13,273					
); Brasil, Mato Grosso do Sul
MS16	B2	Fazenda A	E	τ 27 13 18	Brasil, Mato Grosso do Sul
MS17	B3	Fazenda A	B	τ 11 11 27 18	Brasil, Mato Grosso do Sul
MS18	B5	Fazenda A	E	α β β β Γ	Argentina (Santa fé 37,43,50,59) / México, Nayarit, Santiago Ixcuintla/ México, Jalisco Tapalpa/ Brasil, São Paulo/Brasil, Goiás/ Brasil, Mato Grosso do Sul
MS19	B8	Fazenda A	E	α β β β Γ	Argentina (Santa fe 37,43,50,59) / México, Nayarit, Santiago Ixcuintla/ México, Jalisco Tapalpa/ Brasil, São Paulo/Brasil, Goiás/ Brasil, Mato Grosso do Sul
MS20	B10	Fazenda A	C	τ 10 13 13 18	Brasil, Mato Grosso do Sul
MS21	B13	Fazenda A	E	α β β β Γ	Argentina (Santa fé 37,43,50,59) / México, Nayarit, Santiago Ixcuintla/ México, Jalisco Tapalpa/ Brasil, São Paulo/Brasil, Goiás/ Brasil, Mato Grosso do Sul
MS22	B18	Fazenda A	B	τ 11 11 27 18	Brasil, Mato Grosso do Sul
MS23	B21	Fazenda A	C	α β β β Γ	Argentina (Santa fé 37,43,50,59) / México, Nayarit, Santiago Ixcuintla/ México, Jalisco Tapalpa/ Brasil, São Paulo/Brasil, Goiás/ Brasil, Mato Grosso do Sul
MS24	B22	Fazenda A	E	EV8 EV8 17	Brasil, Mato Grosso do Sul
MS25	B23	Fazenda A	E	τ 11 10 15	Brasil, Mato Grosso do Sul
MS26	B28	Fazenda A	E	α β Γ	Argentina (Chaco 2 var 2; México, Nayarit Santiago Ixcuintla); Brasil, Mato Grosso do Sul

Tabela 9. Organização das oito novas estirpes de *m*sp1 α de *A. marginale*, com seus genótipos, quantificação absoluta e identificação dos bovinos positivos da Fazenda A, Pantanal brasileiro.

Amostras	Animais	Novas estirpes		Genótipos	
		(Catanesse et al., 2016)	Quantidade	(Estrada Peña et al., 2009)	Riquetsemia absoluta qPCR (<i>m</i> sp1 β / μ L)
MS20	Bezerro 10				PM*
MS2	Vaca 8				1,97x10 ⁵
MS3	Vaca 10	τ-10-13-13-18	3	C	2,20x10 ⁶
MS4	Vaca 13				2,77x10 ³
MS6	Vaca 24	τ-27-18	2	E	1,70x10 ³
MS7	Vaca 26				3,45x10 ³
MS24	Bezerro 22	EV8-EV8-17	2	E	1,76x10 ³
MS8	Vaca 32	α-β-β-β-100	1	E	9,85 x 10 ³
MS1	Vaca 31				7,11x10 ³
MS12	Vaca 20	EV7-11-10-15	2	E	1,45x10 ³
MS17	Bezerro 3				9,53x10 ⁵
MS22	Bezerro 18	τ-11-11-27-18	2	B	1,30x10 ⁶
MS25	Bezerro 23	τ-11-10-15	1	E	PM*
MS16	Bezerro 2	τ-27-13-18	1	E	1,86 X 10 ⁵

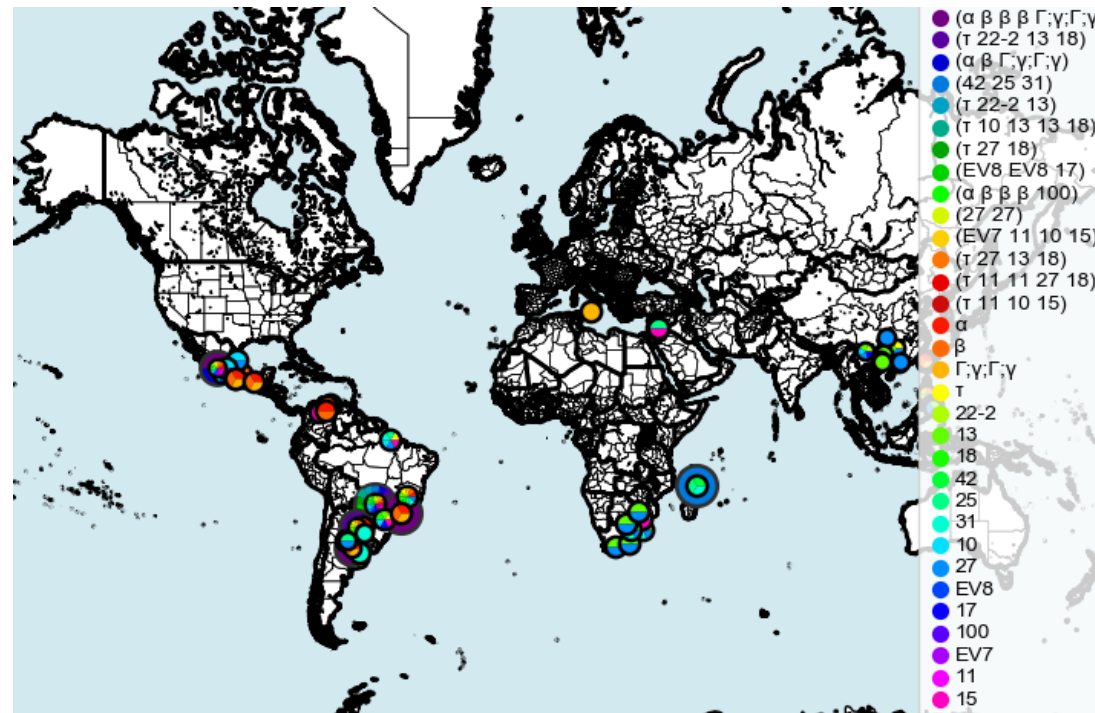


Figura 7. Distribuição mundial das 14 estirpes de *A. marginale* (gene *msp1a*) (τ -10-13-13-18; τ -27-18; EV8-EV8-17; α - β - β - β -100; EV7-11-10-15; τ -11-11-27-18; τ -11-10-15; α - β - β - β - Γ ; α - β - Γ ; 27-27; 42-25-31; τ -27-13-18; τ -22-2-13-18; τ -22-2-13) encontradas em bovinos de corte no Pantanal brasileiro. Seis estirpes (α - β - β - β - Γ ; α - β - Γ ; 27-27; τ -22-2-13-18; τ -22-2-13) também foram previamente relatadas em outras localidades do mundo, como 27-27 na China (AM3-27a), α - β - β - β - Γ na Argentina (Chaco) e México (Nayarit / Santiago), 42-25-31 em Madagascar (Sofia), τ -22-2-13-18 e τ -22-2-13 na Argentina (Chaco 2 var 1; Chaco3 var1; Chaco7; Chaco 8). Todos os resultados foram gerados no software *RepeatAnalyzer*.

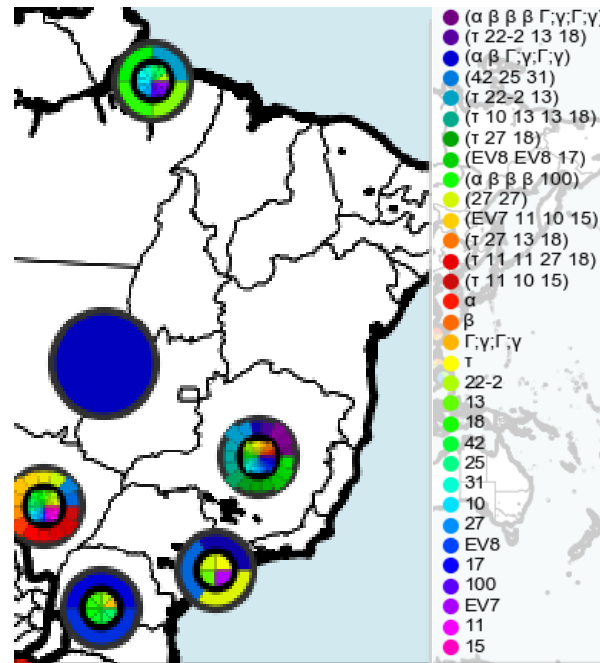


Figura 8. Distribuição nacional das 14 estirpes de *A. marginale* (gene *msp1a*) (τ -10-13-13-18; τ -27-18; EV8-EV8-17; α - β - β - β -100; EV7-11-10-15; τ -11-11-27-18; τ -11-10-15; α - β - β - β - Γ ; α - β - Γ ; 27-27; 42-25-31; τ -27-13-18; τ -22-2-13-18; τ -22-2-13) encontradas em bovinos de corte no Pantanal brasileiro. Das estirpes encontradas, apenas duas foram relatadas anteriormente em solo brasileiro: 27-27 em Minas Gerais [(UFMG2), (Minas-5) e Minas Gerais (13,273)], α - β - β - β - Γ em São Paulo (Lins e Taiacu) e Goiás (Mambai). Todos os resultados foram gerados no software *RepeatAnalyzer*.

Tabela 10. Índices métricos de diversidade genética do gene *msp1 α* de *A. marginale* encontrados em gado de corte no Pantanal brasileiro, comparado a outros estados brasileiros (São Paulo, Minas Gerais, Pará (búfalos), Rio de Janeiro e Goiás), bem como Brasil (geral) e mundo (geral), segundo o Software *RepeatAnalyzer*.

Métrica	Pantanal brasileiro - MS (Souza Ramos et al., 2018)	São Paulo (Taiacu) (Silva et al., 2016)	São Paulo (Lins) (Machado et al., 2015)	Minas Gerais (Poohl et al., 2013)	Minas Gerais (De la Fuente et al., 2004)	Pará-Marajó (Silva et al., 2014a)	Paraná (Vidotto et al., 2016)	Rio de Janeiro (Silva et al., 2014b)	RJ (Baêta et al., (2015)	Goiás (Machado et al., 2015)	Brasil (Geral)	Mundo
GDM1-Local^a	0,854	0,802	0,8	0,933	0,817	0,75	1	0,792	0,8	0,675	0,828	0,757
GDM1-Global^a	0,339	0,3	0,75	0,909	0,375	0,75	1	0,56	0,71	0,333	0,221	0,154
GDM2-Local^a	0,051	0,093	0,094	0,028	0,086	0,117	0	0,097	0,094	0,153	0,075	0,089
GDM2-Global^a	0,037	0,132	0,093	0,027	0,037	0,117	0	0,05	0,11	0,157	0,034	0,008

Em relação à frequência de distribuição, as repetições **17, 25, 31, 42, EV8, 100, EV7** ocorreram apenas uma vez; as repetições **15, r, 22-2** ocorreram duas vezes; as repetições **11, 10, β , α** ocorreram três vezes; **13, 27** quatro vezes; a repetição **18** e **t** ocorreram o maior número de vezes com cinco e sete repetições, respectivamente, mostrando-se como as mais difundidas (**Figura 9**). A relação entre a quantidade de repetições com o número de aminoácidos revelou que uma SSR apresentou tamanho entre **22-24** aminoácidos; duas SSR apresentaram um tamanho de **28** aminoácidos e mais duas SSR apresentaram entre **30-32** aminoácidos. O maior número de repetições (**12-14**) apresentou tamanho entre **28** e **30** aminoácidos (**Figura 10**). A correlação entre o número de genótipos e o número de SSR encontradas revelou que um genótipo apresentou duas repetições; cinco genótipos apresentaram três repetições; quatro genótipos apresentaram quatro repetições, e outros quatro genótipos apresentaram cinco repetições (**Figura 11**).

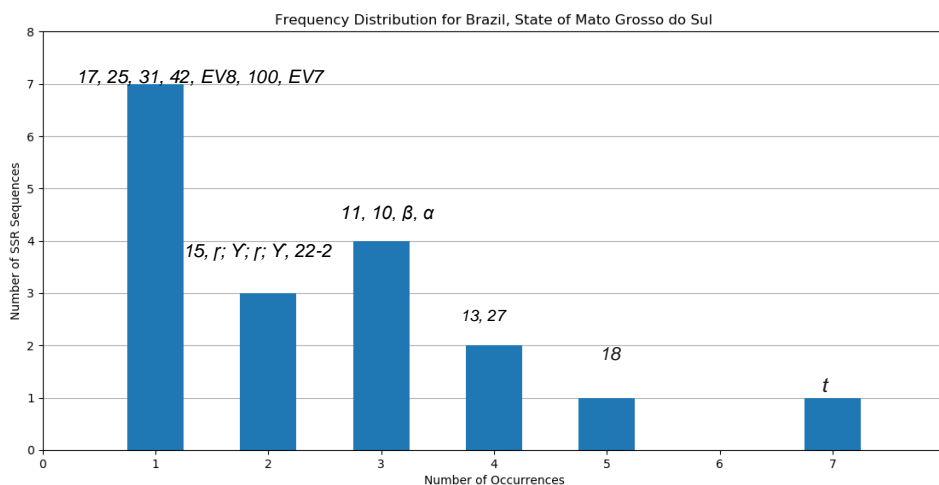


Figura 9. Número de ocorrência de cada repetição em *tandem* encontrada no gene *msp1 α* de estirpes de *A. marginale* em bovinos de corte no Pantanal brasileiro. A repetição **T** apresentou-se mais difundida (sete repetições) que as demais, seguida pela **18** (cinco repetições).

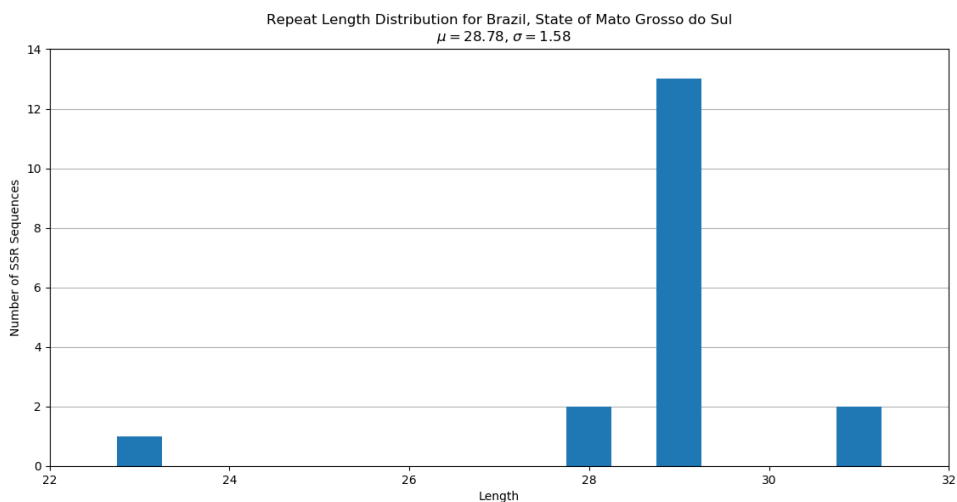


Figura 10. Número de repetições em *tandem* do gene *msp1a* e seu tamanho (número de aminoácidos) encontradas em estirpes de *A. marginale* em bovinos de corte no Pantanal brasileiro. A maior parte das SSR apresentaram tamanho entre 28 e 30 aminoácidos.

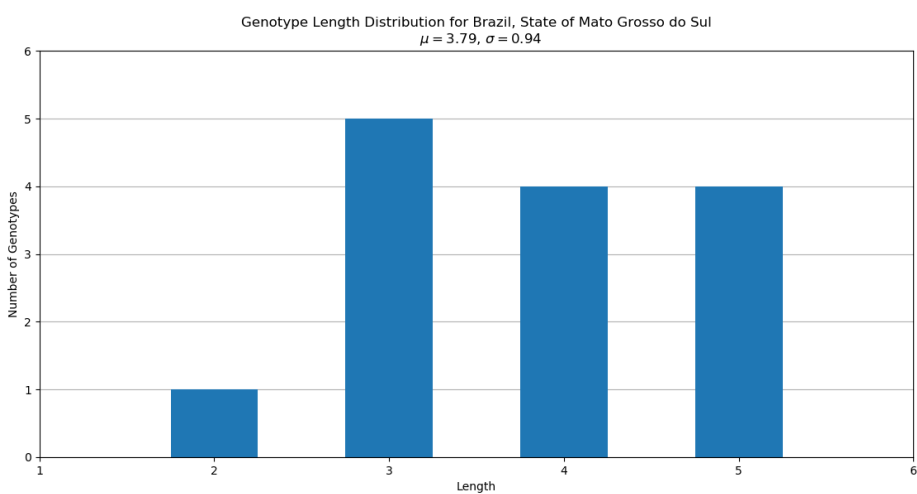


Figura 11. Correlação entre o número de genótipos e o número de SSR encontradas em estirpes de *A. marginale* em bovinos de corte no Pantanal brasileiro. Cinco genótipos apresentaram três repetições e quatro genótipos cinco repetições.

5.5.1.4. Análise do número de genótipos

Entre as 26 sequências do gene *msp1α* analisadas foram identificados 14 genótipos, com 324 sítios variáveis e alta diversidade e polimorfismo (HD = $0,928 \pm 0,032$ / $\pi = 0,09696 \pm 0,05555$ e K = 36,74769) (Tabela 11).

Tabela 11. Polimorfismo e diversidade genética de sequências *msp1α* de *A. marginale* detectadas em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro.

ESPÉCIE (gene-alvo)	(PB)	N	VS	GC %	H	HD (MEAN \pm SD)	π (MEAN \pm SD)	K
<i>Anaplasma marginale</i> (<i>msp1α</i>)	778	26	324	0,500	14	$0,928 \pm 0,032$	$0,09696 \pm 0,05555$	36,74769

N, número de seqüências analisadas; VS, número de sítios variáveis; GC, conteúdo G x C; H, número de genótipos; HD, diversidade de genótipos; SD, desvio padrão; π , diversidade de nucleotídeos (por local = PI); K, número médio de diferença de nucleotídeos.

5.5.2. Análises baseadas no gene *msp4* de *Anaplasma marginale*

5.5.2.1. Ensaio de cPCR para o gene *msp4* de *A. marginale*

Dos animais positivos na qPCR, 14 (6,16% - 14/227) mostraram-se positivos na cPCR para o gene *msp4* de *A. marginale*, correspondendo a 4 vacas e 10 bezerros oriundos da Fazenda A. A Tabela 12 apresenta a identificação dos animais positivos para o gene *msp4*, quantificação na qPCR (gene *msp1β*) e resultado do iELISA.

Tabela 12. Amostras de vacas e bezerros (n=14) do Pantanal brasileiro positivas na cPCR para o gene *msp4* de *Anaplasma marginale* com identificação, valor de quantificação (qPCR baseada no gene *msp1β*) e resultado do iELISA.

Amostra	Identificação	Propriedade	Riquetsemia absoluta qPCR (<i>msp1β</i> / μL)	ELISA
MS1	V3	Fazenda A	8,33x10 ⁹	Positiva
MS2	V8	Fazenda A	1,97x10 ⁵	Positiva
MS3	V10	Fazenda A	2,20x10 ⁶	Positiva
MS4	B1	Fazenda A	5,25x10 ⁵	Positiva
MS5	B2	Fazenda A	1,86x10 ⁵	Positiva
MS6	B3	Fazenda A	9,53x10 ⁵	Positiva
MS7	B8	Fazenda A	6,86x10 ⁵	Positiva
MS8	B10	Fazenda A	PM	Positiva
MS9	B33	Fazenda A	1,52x10 ⁶	Positiva
MS10	B37	Fazenda A	1,57x10 ⁶	Positiva
MS11	B42	Fazenda A	PM*	Positiva
MS12	B44	Fazenda A	PM*	Positiva
MS13	B46	Fazenda A	4,42x10 ⁴	Positiva
MS14	V14	Fazenda A	PM*	Positiva

5.5.2.2. Análise de identidade das sequências de nucleotídeos do gene *msp4* de *A. marginale* pelo BLASTn

A identidade das 14 sequências analisadas para o gene *msp4* variou de 99% a 100% para sequências de *A. marginale* previamente depositadas no GenBank, com valores de *query coverage* variando de 99% a 100% e *E-value* de 0. A análise revelou que 92,85% (13/14) das amostras mostraram maior identidade para sequências de *A. marginale* detectadas na Índia e apenas 7,14% (1/14) com uma sequência do referido agente obtida em Minas Gerais. Todos os dados obtidos no BLASTn, bem como o número de acesso no GenBank, estão apresentados na **Tabela 13**.

Tabela 13. Máxima porcentagem de identidade obtida pelo BLASTn para sequências de *A. marginale* (gene *msp4*) detectadas em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro.

ID (<i>msp4</i>)	Tamanho (pb)	Identidade (%)	Query Coverage (%)	País e Fontes	Número de acesso no GenBank
MS1	783	100	100	Índia (GEORGE et al., 2017)	KX989516
MS2	778	100	100	Brasil (MG) (LINS et al. (2014)	KM624516
MS3	699	100	100	Índia (GEORGE et al., 2017)	KX989516
MS4	746	100	100	Índia (GEORGE et al., 2017)	KX989519
MS5	736	100	100	Índia (GEORGE et al., 2017)	KX989519
MS6	724	100	100	Índia (GEORGE et al., 2017)	KX989516
MS7	634	100	100	Índia (GEORGE et al., 2017)	KX989520
MS8	805	100	100	Índia (GEORGE et al., 2017)	KX989516
MS9	700	100	100	Índia (GEORGE et al., 2017)	KX989519
MS10	695	100	100	Índia (GEORGE et al., 2017)	KX989520
MS11	727	99	99	Índia (GEORGE et al., 2017)	KX989519
MS12	650	100	100	Índia (GEORGE et al., 2017)	KX989520
MS13	649	100	100	Índia (GEORGE et al., 2017)	KX989520
MS14	773	99	100	Índia (GEORGE et al., 2017)	KX989519

5.5.2.3. Valores de identidade e divergência entre sequências de nucleotídeos de *msp4* de *A. marginale* detectada em bovinos de corte no Pantanal brasileiro pelo Bioedit

A identidade entre as sequências *msp4* de *A. marginale* obtidas no Pantanal brasileiro mostrou uma variação de 94 a 100%. A menor porcentagem de identidade (94%) foi encontrada entre as sequências MS1 e MS6, MS8 e MS11, e entre MS14 e MS13. Por outro lado, a maior porcentagem de identidade (100%) foi encontrada entre as sequências MS2, MS4, MS6, MS9, MS10 e MS11. A maior divergência de *msp4* foi de 6% correspondente a amostra **MS13** em relação às amostras MS2, MS3, MS5, MS6, MS7, MS9, MS10, MS11, MS12. Por outro lado, a menor divergência observada foi de 0% correspondente à comparação entre amostras **MS10** – MS2, MS3, MS5, MS6, MS7, MS9; **MS11**- MS2, MS3, MS5; **MS6**- MS7, MS9, MS10; **MS12** - MS4, MS8; **MS14** - MS2, MS3, MS5, MS6, MS7, MS9, MS10, MS11, MS12 (**Tabela 14**). Das 14 sequências *msp4* de *A. marginale* obtidas, a sequência **MS2** apresentou uma mutação de **T x G** na posição 316 do alinhamento (**Figura 13**).

Tabela 14. Matriz de identidade e divergência entre sequências de nucleotídeos do gene *msp4* de *A. marginale* detectadas em bovinos de corte no Pantanal brasileiro.

	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8	MS9	MS10	MS11	MS12	MS13	MS14
MS1	ID	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%
MS2	100%	ID	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%
MS3	99%	99%	ID	99%	99%	99%	100%	99%	99%	99%	99%	100%	95%	99%
MS4	100%	100%	99%	ID	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%
MS5	100%	100%	99%	100%	ID	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%
MS6	100%	100%	99%	100%	100%	ID	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%
MS7	99%	99%	100%	99%	99%	99%	ID	99%	99%	99%	99%	100%	95%	99%
MS8	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	ID	100%	100%	100%	99%	94%	100%
MS9	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	ID	100%	100%	99%	94%	100%
MS10	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	ID	100%	99%	94%	100%
MS11	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	ID	99%	94%	100%
MS12	99%	99%	100%	99%	99%	99%	100%	99%	99%	99%	99%	ID	95%	99%
MS13	94%	94%	95%	94%	94%	94%	95%	94%	94%	94%	94%	95%	ID	94%
MS14	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	ID

```

          310      320      330      340      350      360      370      380      390
MS1  ACGGGCAGTACGCAAAAAGTGGTGC GGAATCTCTGGCAGCTATTACCCGCGACGCTAACATTACTGAGACCAATTACTTCGTAGTCAAAATTGAT
MS2  .....G.....
MS3  .....
MS4  .....
MS5  .....
MS6  .....
MS7  .....
MS8  .....
MS9  .....
MS10 .....
MS11 .....
MS12 .....
MS13 .....
MS14 .....

```

Figura 12. Alinhamento de nucleotídeos das sequências *msp4* de *A. marginale* detectada em bovinos de corte no Pantanal brasileiro, com destaque para a área de mutação (T x G) na posição 316 da sequência MS2.

5.5.2.4. Matriz de identidade e divergência entre sequências do gene *msp4* de *A. marginale* com as sequências obtidas na plataforma Blastn

Foram selecionadas 22 sequências do gene *msp4* previamente depositadas no GenBank, com valores de identidade e *query coverage* variando de 99% a 100% e *E-value* de 0, oriundas da Índia, Espanha, México, Argentina, Venezuela, Suíça, Itália, Israel, EUA, China e Brasil (MG). O maior valor de identidade (100%) foi obtido com amostras da Índia, Espanha, México, Argentina e China, já o menor valor (99%) foi obtido em relação às sequências previamente detectadas na Suíça, Itália, Israel, Tunísia, EUA e Brasil (MG).

A matriz de identidade de nucleotídeos obtida pelo Bioedit entre as sequências *msp4* de *A. marginale* obtidas no Pantanal e aquelas obtidas no GenBank mostrou uma variação de 93% a 100%. A menor porcentagem de identidade (93%) e a maior divergência (6%) foi encontrada entre as sequências MS13 com AY786994 (Israel), AY010251 (EUA), AY010294 (EUA), KF739433 (Espanha), KJ512169 (Tunísia) e KJ512172 (Tunísia). Por outro lado, a maior porcentagem de identidade (100%) e a menor divergência (0%) foi encontrada entre as sequências MS1; MS4; MS5; MS6; MS8;MS9; MS10; MS14 - KX989516 – Índia; KM624516- Minas Gerais; KX989519-Índia; KX989520 – Índia; JN564647- México; AF428086- Argentina; AF428083- México; MG676459- Índia; MG676453- Índia; KM624517- Minas Gerais; EU677383- Tiwan; EU283844- Espanha; AY702919- Itália; AY851150- Suíça; AY737009- Venezuela; EF053264- México; AY456002-Espanha; AY829458- Israel. MS2 -KX989516 – Índia; KM624516- Minas Gerais; KX989519-Índia; KX989520 – Índia; JN564647- México;

AF428086- Argentina; AF428083- México; MG676459- Índia; MG676453- Índia;
KM624517- Minas Gerais; EU677383- Tiwan; EU283844- Espanha; AY702919- Itália;
AY851150- Suíça; AY737009- Venezuela; EF053264- México; AY456002-Espanha
(Tabela15).

Tabela15. Matriz de identidade e divergência entre sequências de nucleotídeos de *msp4* de *Anaplasma marginale* detectadas em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro em comparação com sequências de outros países selecionadas via GenBank.

Seq->	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8	MS9	MS10	MS11	MS12	MS13	MS14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
MS1	ID	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
MS2	100%	ID	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
MS3	99%	99%	ID	99%	99%	99%	100%	99%	99%	99%	99%	100%	95%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%	98%	98%	
MS4	100%	100%	99%	ID	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
MS5	100%	100%	99%	100%	ID	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
MS6	100%	100%	99%	100%	100%	ID	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%
MS7	99%	99%	100%	99%	99%	99%	ID	99%	99%	99%	99%	100%	95%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%	98%	98%		
MS8	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	ID	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
MS9	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	ID	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
MS10	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	ID	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
MS11	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	ID	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
MS12	99%	99%	100%	99%	99%	99%	100%	99%	99%	99%	99%	ID	95%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%	98%	98%			
MS13	94%	94%	95%	94%	94%	94%	95%	94%	94%	94%	94%	95%	ID	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	94%	93%	93%	93%	93%	93%	93%		
MS14	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
KX989516	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%
KM624516	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%		
KX989519	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
KX989520	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
JN564647	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
AF428086	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
AF428083	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
MG676459	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
MG676453	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
KM624517	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
EU677383	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
EU283844	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
AY702919	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	
AY851150	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%
AY737009	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%		
EF053264	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	99%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	100%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%		
AY456002	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	98%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	ID	100%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%		
AY829458	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	98%	94%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	ID	100%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%		
AY786994	100%	99%	99%	100%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	99%	98%	93%	100%	100%	99%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	99%	99%	100%	ID	99%	99%	99%	99%	99%			
AY010251	99%	99%	99%	99%	99%	99%	98%	99%	99%	99%	99%	98%	93%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	100%	99%	99%	99%	ID	99%	99%	99%	99%	99%			
AY010248	99%	99%	98%	99%	99%	99%	98%	99%	99%	99%	99%	98%	93%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	100%	100%	100%	99%		
KF739433	99%	99%	98%	99%	99%	99%	98%	99%	99%	99%	99%	98%	93%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	100%	ID	100%	100%		
KJ512169	99%	99%	98%	99%	99%	99%	98%	99%	99%	99%	99%	98%	93%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	100%	ID	100%	100%		
KJ512172	99%	99%	98%	99%	99%	99%	98%	99%	99%	99%	99%	98%	93%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	100%	ID	100%		

KX989516 – ÍNDIA; KM624516- MINAS GERAIS; KX989519-ÍNDIA; KX989520 – ÍNDIA; JN564647- MÉXICO; AF428086- ARGENTINA; AF428083- MÉXICO; MG676459- ÍNDIA; MG676453- ÍNDIA; KM624517- MINAS GERAIS; EU677383- TIWAN; EU283844- ESPANHA; AY702919- ITÁLIA; AY851150- SUIÇA; AY737009- VENEZUELA; EF053264- MÉXICO; AY456002-ESPANHA; AY829458- ISRAEL; AY010251-EUA; AY010248-EUA; KF739433-ESPANHA; KJ512169-TUNÍSIA; KJ512172-TUNÍSIA

5.5.2.5. Genótipos de *Anaplasma marginale* baseados no gene *msp4*

Entre as 14 sequências do gene *msp4* obtidas no presente estudo, foram identificados 2 genótipos, apresentando $\pi = 0,00024 \pm 0,0020$ HD = $0,1429 \pm 0,00011029$ e K= 0,14286 (Tabela 16). Entre as 38 sequências do gene *msp4* analisadas (correspondendo àquelas detectadas no presente estudo e outras retiradas do GenBank), foram identificados 12 genótipos, apresentando polimorfismo de HD = $0,570 \pm 0,004819$ e K= 1,96 (Tabela 17).

Tabela 16. Polimorfismo e diversidade genética de sequências *msp4* de *Anaplasma marginale* detectadas em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro.

ESPÉCIE (gene-alvo)	(PB)	N	VS	GC %	H	HD (MEAN \pm SD)	π (MEAN \pm SD)	K
<i>Anaplasma marginale</i> (<i>msp4</i>)	656	14	1	0,484	2	0,1429 \pm 0,00011029	0,00024 \pm 0,0020	0,14286

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

Tabela 17. Polimorfismo e diversidade genética entre as sequências *msp4* de *Anaplasma marginale* detectadas em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro em conjunto com aquelas obtidas via GenBank.

ESPÉCIE (gene-alvo)	(PB)	N	VS	GC %	H	HD (MEAN \pm SD)	π (MEAN \pm SD)	K
<i>Anaplasma marginale</i> (<i>msp4</i>)	639	38	1	0,48	1	0,570 \pm 0,004819	0,00328 \pm 0,00085	1,96

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

5.5.2.6. Análise de entropia de aminoácidos para o gene *msp4* de *A. marginale*

As análises de entropia de aminoácidos realizadas a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos do gene *msp4* de *A. marginale* estão

apresentadas nas **Figura14**. Foram observados dois picos de alta entropia logo no início da sequência de aminoácidos, variando em amplitude de 0,25 – 0,59.

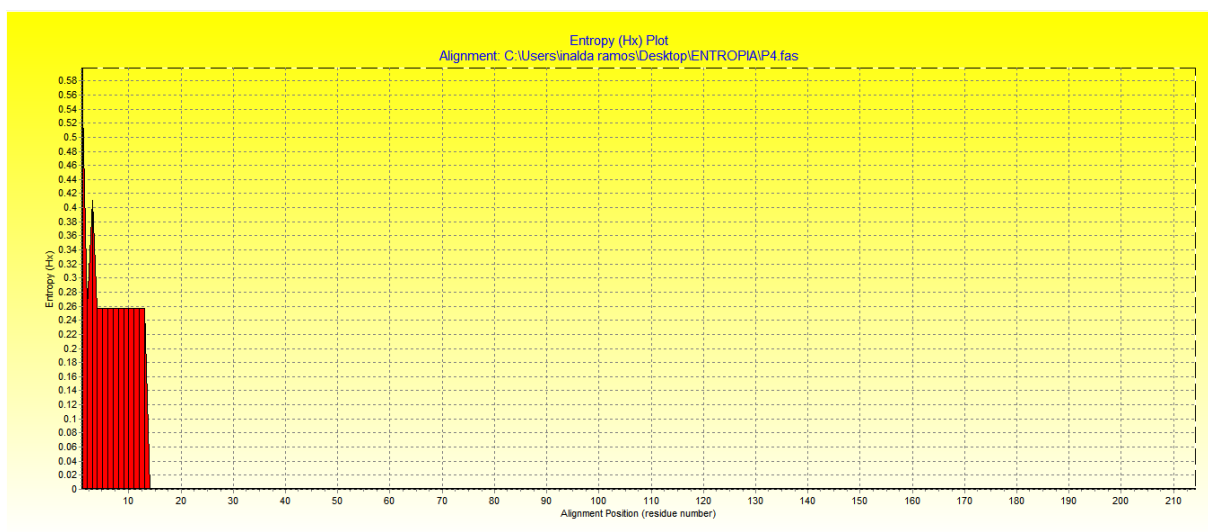


Figura 13. Entropia de aminoácidos obtidas das sequências do gene *msp4* de *A. marginale* obtidas de amostras de sangue de bovinos do Pantanal brasileiro.

5.5.2.7. Análise de distância de nucleotídeos

A análise de distância por meio do software *Splitstree* com os parâmetros “Neighbour-Net e “Uncorrected p-distance mostrou que as 14 sequências *msp4* de *A. marginale* detectadas em bovinos de corte no Pantanal brasileiro foram agrupadas em um único grupo com aquelas previamente detectadas na Índia, Espanha, México, Venezuela, Suíça, Espanha, Itália, Minas Gerais (Brasil), Argentina e China (**Figura 15**). Na análise das 38 sequências pelo software DnaSP6, constatou-se a formação de 12 genótipos, sendo o genótipo #1 o mais distribuído, sendo o mesmo detectado em bovinos na Índia, Espanha, México, Venezuela, Suíça, Espanha, Itália, Minas Gerais (Brasil), Argentina e China. O genótipo #1, o qual correspondeu à maioria (50%; 19/38) das sequências *msp4* detectadas em bovinos no Pantanal brasileiro, mostrou-se relacionado aos genótipos #2, #8 e #9, detectados, respectivamente, em bovinos no Brasil (Pantanal brasileiro e Minas Gerais), México e Itália (**Figura 16**).

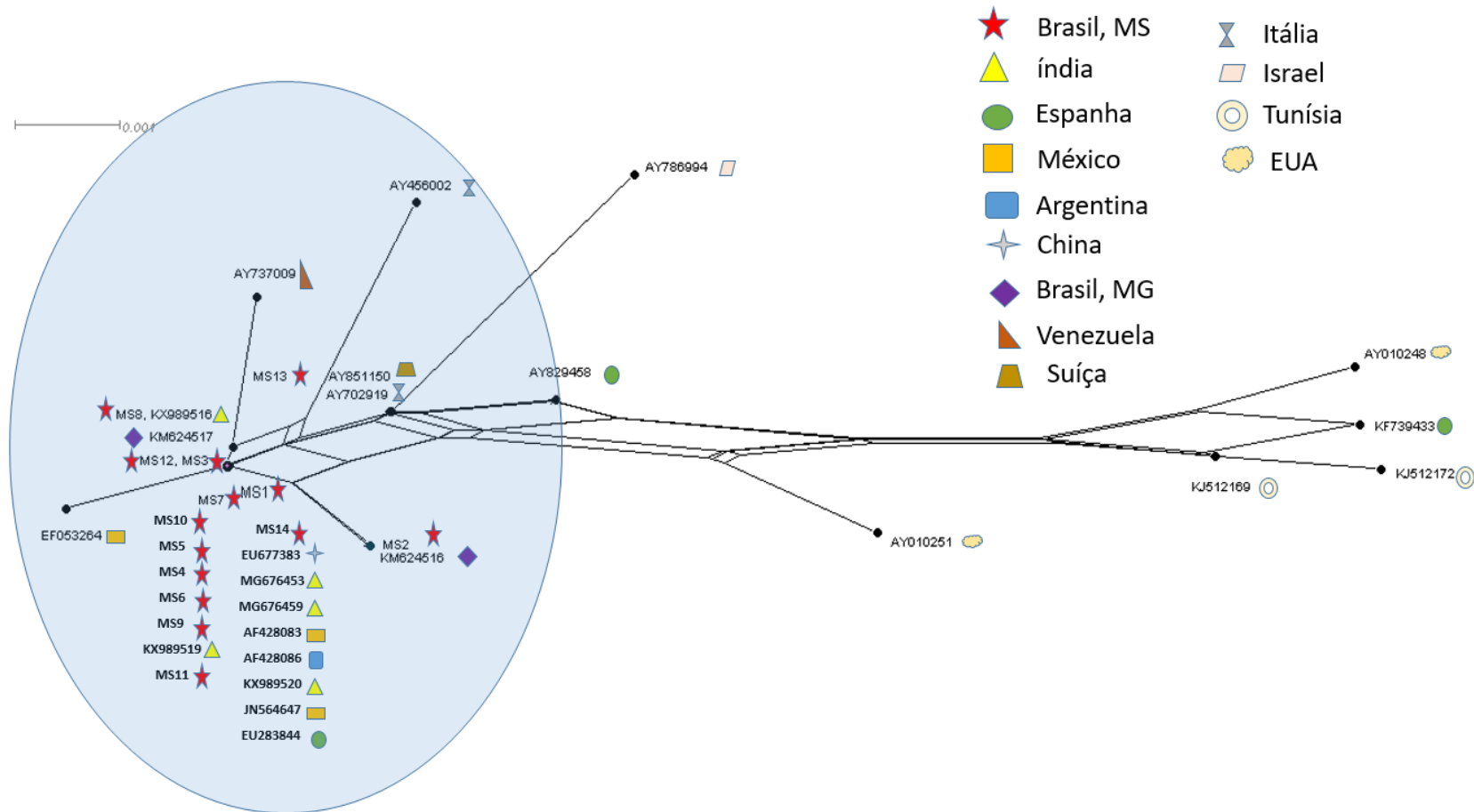
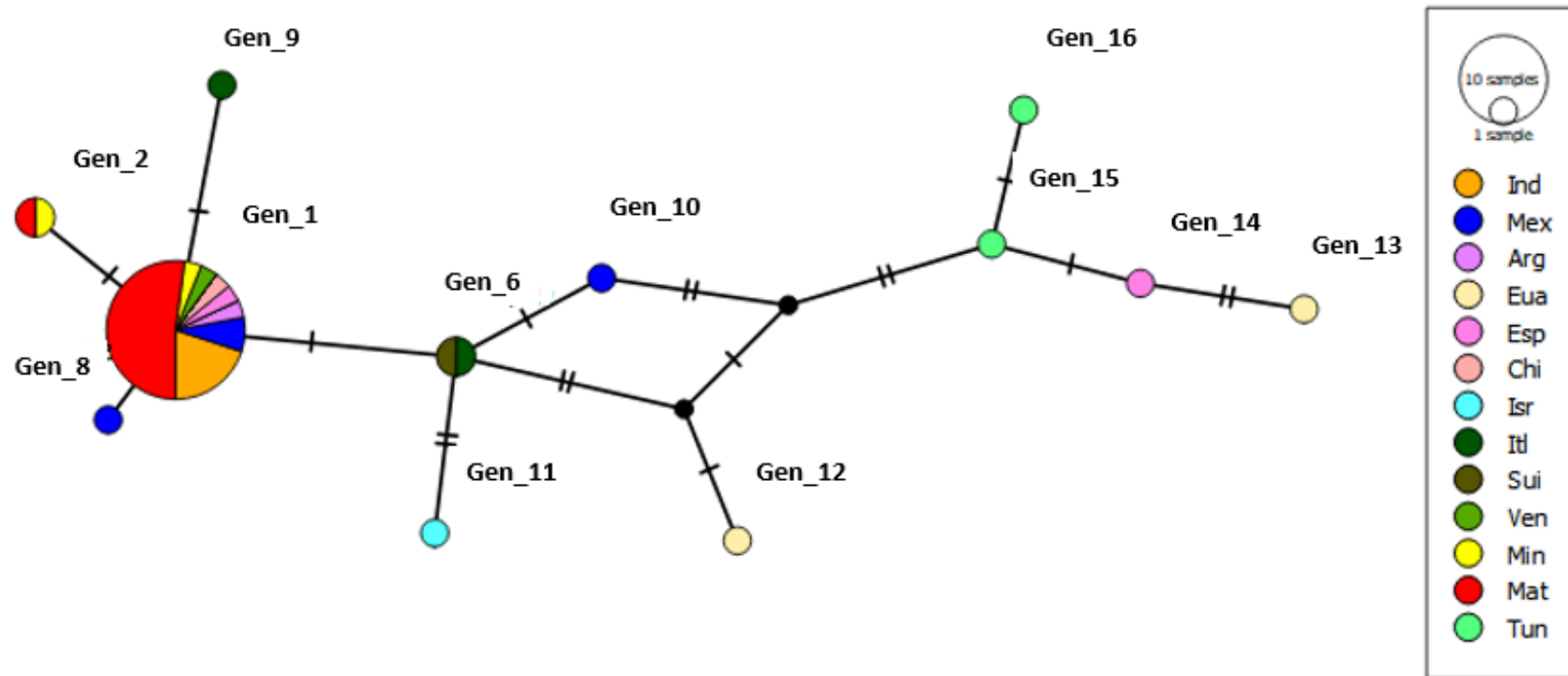


Figura 14. Análise de distância por meio do software *Splitstree* com os parâmetros “Neighbour-Net e “Uncorrected p-distance”. As sequências do gene *msp4* do Pantanal brasileiro formaram um clado com as sequências da Índia, Espanha, México, Argentina, China, Venezuela, Itália e MG (Brasil).



*Ind – Índia; Mex – México; Arg – Argentina; EUA – Estados Unidos; Esp – Espanha; Chi- Chile; Isr – Israel; Itl – Itália; Sui – Suíça; Ven – Venezuela; Min – Minas Gerais, sudeste do Brasil; Mat – Mato Grosso do Sul, centro-oeste do Brasil; Tun – Tunísia.

Figura 15. Rede de genótipos *msp4* de *A. marginale* detectados em bovinos de corte amostrados no Pantanal brasileiro em conjunto com aqueles obtidos via GenBank.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no iELISA mostraram uma alta taxa de frequência de animais soropositivos (72,2%) para *Anaplasma* spp. Embora *A. marginale* tenha sido o único agente do gênero *Anaplasma* confirmado como causador de doenças em bovinos no Brasil até o momento, *Anaplasma* spp. intimamente relacionado com *A. phagocytophilum*, *A. bovis* e *A. platys* foram detectados em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) no Pantanal (SACCHI et al., 2012). Portanto, não podemos descartar a possibilidade de reatividade sorológica cruzada na técnica de ELISA baseada em antígenos brutos, uma vez que tais genótipos de *Anaplasma* recém-descritos também poderiam infectar ruminantes domésticos no Brasil.

Na análise da frequência de animais soropositivos, as vacas apresentaram maior soropositividade quando comparadas aos bezerros. Nas fazendas amostradas, as vacas permanecem grande parte de suas vidas dentro do rebanho e criação, com aumento da exposição ao agente e, conseqüentemente, altos níveis de anticorpos para *A. marginale* (PALMER et al., 1999; VIDOTTO et al., 2004). Ao estudar gado de corte, Grau et al. (2013) verificaram que vacas cronicamente infectadas com *A. marginale* e sem história de anaplasnose aguda poderiam infectar sua prole por via transplacentária.

Na análise dos resultados da qPCR pela idade dos animais, foi encontrado maior número de bezerros positivos (69%) quando comparados às vacas (44,5%). Adicionalmente, maior quantificação de *msp1β* de *A. marginale* foi encontrada em bezerros ($1,3 \times 10^6$) quando comparados às vacas ($3,9 \times 10^4$). Esse achado pode ser devido ao desenvolvimento do sistema imunológico imaturo dos bezerros. Segundo Palmer et al. (1999), as vacas estariam mais predispostas a infecções crônicas, podendo atuar como fonte de infecção para vetores mecânicos (moscas e tabanídeos) e biológicos (carrapatos Ixodidae). Esses animais também podem disseminar *A. marginale* de geração em geração através da via transplacentária, embora a confirmação deste modo de transmissão no presente estudo não tenha sido feita.

A correlação entre a magnitude da quantificação de *msp1β* de *A. marginale* estimada pela qPCR e pelo HT foi considerada estatisticamente

inexistente, uma vez que os animais não apresentaram sinais clínicos ou anemia, o que pode sugerir alguma resistência dos animais ao agente. Bilhassi et al. (2014) investigaram a influência da raça em um estudo comparando a infecção por *B. bovis* em Nelore, Angus e bovinos mestiços de duas áreas endêmicas para babesiose no estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. A prevalência de infecção não mostrou diferença significativa, sendo 96%, 100% e 98% para os três grupos genéticos, respectivamente. No entanto, quando se verificaram níveis parasitêmicos estimados por qPCR, estes foram maiores nos animais Angus e nos bovinos mestiços do que nos animais Nelore. Futuros estudos visando investigar a influência da raça na suscetibilidade à anaplasmoze bovina são necessários.

Analisando as 26 sequências *msp1α* de *A. marginale* obtidas no presente estudo, o genótipo E (76,9%) foi mais prevalente, seguido pelos genótipos C (15,4%) e B (7,7%). Os resultados são semelhantes aos relatados em bovinos mestiços (SILVA et al., 2015) e búfalos e carrapatos associados (*R. microplus* e *A. sculptum*) (SILVA et al., 2014b) no Rio de Janeiro. Embora tenha havido predominância do genótipo E em todos os estudos realizados no Brasil até o momento, os genótipos B e C, previamente relatados apenas uma vez no território brasileiro, também foram identificados no presente estudo. Esse resultado corrobora Estrada-Peña et al. (2009), que observou que na América do Sul, especialmente no Brasil e na Argentina, o genótipo E foi o mais encontrado. A prevalência do genótipo E quando comparado aos demais genótipos pode sugerir uma melhor adaptação desse genótipo para bovinos e carrapatos no Brasil. Estrada-Peña et al. (2009) também relataram que a distância SD-ATG dos 23 nucleotídeos associados ao genótipo E, que tem sido correlacionada com altos níveis de expressão da proteína *msp1α*, poderia estar associada a um maior potencial de infectividade dos isolados com esta repetição em tandem.

No presente estudo, seis estirpes detectadas já foram relatadas no mundo, a saber: α - β - β - β - Γ ; α - β - Γ ; 27-27; 42-25-31; τ -22-2-13-18; τ -22-2-13. Neste sentido, Poohl et al. (2013) relataram a a estirpe 27-27 em bovinos no estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. Por outro lado, a linhagem α - β - β - β - Γ foi relatada em bovinos leiteiros nos estados de São Paulo (Lins e Taiacu)

(MACHADO et al., 2015; SILVA et al., 2016), Goiás, Mambaí (MACHADO et al., 2015) e Rio de Janeiro (SILVA et al., 2014c). A estirpe de *A. marginale* mais difundida no Brasil, α - β - β - β - Γ , também foi a mais prevalente no presente estudo (19,2%; 5/26), correspondendo a quatro amostras pertencentes ao genótipo E e uma a genótipo C. Embora a anaplasmose bovina clínica não tenha sido observada no presente estudo, a presença da cepa α - β - β - β - Γ tem sido associada a surtos de anaplasmose clínica em vacas leiteiras no México (ALMAZÁN et al., 2008) e Brasil (SILVA et al., 2015). Esta estirpe tem sido associada a uma alta infestação pelo carrapato *R. microplus* na América do Sul (SCOLES et al., 2005; DE LA FUENTE et al., 2007).

Oito estirpes, que nunca haviam sido descritas anteriormente, foram relatadas no presente estudo (τ -10-13-13-18; τ -27-18; EV8-EV8-17; α - β - β - β -100; EV7 -11-10-15; τ -11-11-27-18; τ -11-10-15; τ -27-13-18). De la Fuente et al. (2001) afirmaram que a ocorrência de mecanismos de transmissão independentes (mecânicos e biológicos) poderia refletir em alta diversidade genética em áreas endêmicas. Essa hipótese foi confirmada em regiões endêmicas brasileiras por Silva et al. (2015), que encontraram animais infectados com múltiplas estirpes de *A. marginale*.

Analisando os índices GDM1 de diversidade genética pelo método RepeatAnalyzer, verificou-se alta diversidade entre os genótipos / estirpes analisados, bem como na região em que o presente estudo foi realizado, indicando a circulação de novos genótipos / estirpes no país. Os baixos valores dos índices GDM2 revelaram uma baixa taxa de dispersão dessas novas estirpes. Em um estudo semelhante realizado na África do Sul, Zamantungwa et al. (2016) verificaram que o aumento do número de novos genótipos / estirpes circulantes indicaria uma maior circulação destes na natureza pela ação da pressão de seleção e consequente mutação. Comparando os resultados do presente estudo com os anteriormente realizados em outros estados brasileiros, também foi observado um alto grau de diversidade genética e baixa dispersão de genótipos / estirpes.

Em áreas endêmicas para anaplasmose bovina nos EUA, Palmer et al. (2004) mostraram que bovinos e carrapatos cronicamente infectados abrigam

isolados geneticamente heterogêneos de *A. marginale*, sugerindo que diferentes estirpes são mantidas durante sua vida ou ciclo biológico, respectivamente. Além disso, De La Fuente et al. (2001) relataram que a heterogeneidade genética de *A. marginale*, que resulta em alta diversidade, pode ser derivada de diferentes mecanismos de transmissão, cada um introduzindo diferentes genótipos e estirpes no rebanho bovino. A venda de bezerros machos para engorda em outras regiões do Brasil e para outros países da América Latina, como a Bolívia, pode dispersar as estirpes de *A. marginale* encontradas no presente estudo. Segundo De La Fuente et al. (2007), as transferências de gado entre diferentes regiões geográficas representam uma importante fonte de dispersão de diferentes isolados de *A. marginale*, o que também contribui para a diversidade genética. As sequências *msp1α* de *A. marginale* detectadas em bovinos de corte no Pantanal brasileiro mostraram elevado polimorfismo e alto grau de entropia comparativamente às sequências *msp4*.

Os genótipos *msp4* de *A. marginale* detectados em bovinos do Pantanal brasileiro mostraram-se filogeograficamente relacionados àqueles circulantes em países das América do Sul e Central, Europa e Ásia. De la Fuente et al. (2002, 2003, 2004) relataram que análises baseadas no gene *msp4* fornecem informações filogenéticas e filogeográficas para isolados de *A. marginale*. Jaimes-Dueñez et al. (2018), ao analisarem filogeograficamente amostras de *A. marginale* detectadas em bovinos leiteiros em um estudo longitudinal, constataram que isolados colombianos mostraram alta relação com isolados mexicanos, brasileiros, venezuelanos, europeus e asiáticos, sugerindo uma alta similaridade genética entre as linhagens mexicanas e sul-americanas. Vidotto et al. (2006) verificaram uma alta similaridade das sequências *msp4* de *A. marginale* detectadas em bovinos leiteiros do Paraná com as oriundas dos EUA, Europa e Ásia.

No Pantanal brasileiro foram detectados dois genogrupos do gene *msp4*, com baixa diversidade e polimorfismo, assim como também fora observado por De la Fuente et al. (2004), George et al. (2017) e Jaimes-Dueñez et al. (2018) em Minas Gerais, na Índia e na Colômbia, respectivamente. Vidotto et al. (2006) constataram que a distribuição filogeográfica das amostras de *A.*

marginale foi melhor demonstrada e mais uniforme pela análise do gene *msh4* em relação ao gene *msh1a*.

Neste estudo, o gene *msh4* foi considerado como um marcador estável para a caracterização filogenética de amostras de *A. marginale*, corroborando com de la Fuente et al. (2004). As 14 sequências do gene *msh4* se agruparam-se em dois genogrupos distintos. Belkahia et al. (2015) relataram que essa heterogeneidade poderia ser explicada, em parte, pela importação de bovinos vivos e / ou pela disseminação de carrapatos infectados. Estrada-Peña et al. (2006) e Rodríguez-Vivas et al. (2014) sugeriram que as condições ambientais de cada país poderiam modular a distribuição geográfica dos genogrupos, embora estudos relacionados à história evolutiva e características epidemiológicas destes genogrupos são ainda necessários para determinar sua importância na pecuária.

VII CONCLUSÕES

- Enquanto a soroprevalência para *A. marginale* em bovinos de corte do Pantanal brasileiro foi alta, a frequência de bovinos positivos para *A. marginale* pela qPCR foi moderada;
- A concordância entre o iELISA e qPCR foi considerada fraca e não foi verificada correlação entre os valores de quantificação pela qPCR e o hematócrito dos animais;
- Oito estirpes, nunca descritas anteriormente, foram relatadas no presente estudo (τ -10-13-13-18; τ -27-18; EV8-EV8-17; α - β - β - β -100; EV7-11-10-15; τ -11-11-27-18; τ -11-10-15; τ -27-13-18), com predominância do genótipo E;
- Os índices de diversidade genética revelaram alta diversidade, indicando a circulação de novos genótipos/estirpes no país, porém com baixa taxa de dispersão;
- As sequências *msp1 α* de *A. marginale* mostraram elevado polimorfismo e alto grau de entropia comparativamente às sequências *msp4*;
- Os dois genótipos de *msp4* detectados em bovinos de corte no presente estudo estão filogeograficamente relacionados àqueles circulantes em ruminantes de países das América do Sul e Central, Europa e Ásia.

VIII REFERÊNCIAS

ABREU, U. G. P.; GOMES E. G.; LOPES, P. S.; SANTOS, H. N. Avaliação sistêmica da introdução de tecnologias na pecuária de gado de corte do Pantanal por meio de modelos de análise envoltória de dados (DEA). **Animal Science**, Cambridge, v. 37, p. 2069-2076, 2008.

ALHO, C. J. R. The Pantanal. *In*: FRASER, L. H.; KEDDY, P. A. (Ed.). **The world's largest Wetl and ecology and conservation**. Cambridge University Press. P.203-271, 2005.

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

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

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

ANDRADE, G. M.; MACHADO, R. Z.; VIDOTTO, M. C.; VIDOTTO, O. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/*msp1b*) prepared from the Jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. **Academy of Sciences**, New York, v. 1026, n. 1, p. 257–266, 2004.

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

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

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

BAÊTA, B. A.; RIBEIRO, A. C. C.; TEIXEIRA, A. R. C.; CABEZAS-CRUZ, A.; PASSOS, L. M. F. Characterization of two strains of *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Rio de Janeiro, Brazil, after propagation in tick cell culture. **Ticks and Tick-Borne Disease**, Muenchen, v. 6, n. 2, p. 141-145, 2015.

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

BENSON, D. A.; MIZRACHI, I. K.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; RAPP, B. A.; WHEELER, D. I. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, p. 17-20, 2002.

BILHASSI, T. B.; OLIVEIRA, H. N.; IBELLI, A. M.; GIGLIOTI, R.; REGITANO, L. C.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C.; BRESSANI, F. A.; MALAGÓ, W. JR.; RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, M. C. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. **Ticks and Tick-Borne Disease**, Muenchen, v. 5, p. 234-238, 2014.

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, DC, v. 41, p. 4172-4177, 2003.

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

BOWIE, A. R.; WHITWORTH, D. J.; ACHTERBERG, E. P.; MANTOURA, R. F. C.; WORSFOLD, P. J. Biogeochemistry of Fe and other trace elements (Al, Co, Ni) in the upper Atlantic Ocean. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, Kidlington, v. 49, n. 4, p. 605–636, 2002.

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

BROWN, W. C.; MCGUIRE, T. C.; ZHU, D.; LEWIN, H. A.; SOSNOW, J.; PALMER, G. H. Highly conserved regions of the immunodominant major surface protein 2 of the genogroup II ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* are rich in naturally derived CD4T lymphocyte epitopes that elicit strong recall responses. **The Journal Immunology**, Rockville Pike, v. 166, n. 2, p. 1114-1124, 2001a.

BROWN, W. C.; PALMER, G. H.; LEWIN, H. A.; MCGUIRE, T. C. CD4(+) T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (*msp1*), a heteromeric complex of *msp1 α* and *msp1 β* , preferentially recognize the *msp1 α* carboxyl terminus that is conserved among strains. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 11, p. 6853–6862, 2001b.

CABEZAS-CRUZ, A.; PASSOS, L. M. F.; LIS, K.; KENNEIL, R.; VALDÉS, J.; FERROLHO, J.; TONK, M.; POHL, A. E.; GRUBHOFFER, L.; ZWEYGARTH,

E.; SHKAP, V.; RIBEIRO, M. F. B.; ESTRADA-PEÑA, A.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J. Functional and immunological relevance of *Anaplasma marginale* major surface protein 1 α sequence and structural analysis. **Plos One**, St. Francisco, v. 8, p. 1-13, 2013.

CAMPOS-PEREIRA, M.; SZABÓ, M. P. J.; BECHARA, G. H.; MATUSHIMA, E. R.; DUARTE, J. M. B.; RECHAV, Y.; FIELDEN, L.; KEIRANS, J. E. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal region of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, Cary, v. 37, p. 979–983, 2000.

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, p. 107-114, 2007.

CATANESE, H. N.; BRAYTON, K. A.; GEBREMEDHIN, A. H. RepeatAnalyzer: a tool for analysing and managing short-sequence repeat data. **BMC Genomics**, London, v. 17, p. 422, 2016.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ESTRADA-PEÑA, A.; NARANJO, V.; ACEVEDO, WHITEHOUSE, K.; MANGOLD, A. J.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J. Phylogeographic analysis reveals association of tick, borne pathogen, *Anaplasma marginale*, *msp1 α* sequences with ecological traits affecting tick vector performance. **BMC Biology**, London, v. 7, n. 57, p. 1-13, 2009.

EWING, S. A. 1981. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: HIDALGO, R. J.; JONES, E. W. (Ed.). Proc. 7th Nat. Anaplasmosis Conf., Mississippi State University, MS, 1981. p. 395–423.

EWING, B. Base-calling of automated sequencer traces using Phred II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 186-194, 1998.

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

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

GARCIA-GARCIA, J. C.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M.; BLOUIN, E. F.; HALBUR, T.; ONET, V. C.; SALIKI, J. T. Mapping of B₁₉ cell epitopes in the N₁ terminal repeated peptides of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 98, n. 3-4, p. 137–151, 2004.

GEORGE, N.; BHANDARI, V.; SHARMA, P. Phylogenetic relationship and genotypic variability in *Anaplasma marginale* strains causing anaplasmosis in India. **Infection Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 48, p. 71-75, 2017.

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

GLEZ-PEÑA, D.; GÓMEZ-BLANCO, D.; REBOIRO-JATO, M.; DEZ-RIVEROLA, F.; POSADA, D. Alter: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 38, p.14-18, 2010.

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

GUO, P.; QI, Y. P.; YANG, L. T.; YE, X.; HUANG, J. H.; CHEN, L. S. Long-term boron-excess-induced alterations of gene profiles in roots of two citrus species differing in boron-tolerance revealed by cDNA-AFLP. **Frontiers In Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 898, 2016.

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

HERRERO, M. V.; PEREZ, E.; GOFF, W. L.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D. P.; MCELWAIN, T. F.; ALVAREZ, V.; ALVAREZ, A.; BUENING,

G. M. Prospective study for the detection of *Anaplasma marginale* Theiler, 1911 (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Costa Rica. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v. 849, n. 1, p. 226-233, 1998.

HOVE, P.; KHUMALO, Z. T. H.; CHAISI, M. E.; OOSTHUIZEN, M. C.; BRAYTON, K. A.; COLLINS, N. E. Detection and Characterisation of *Anaplasma marginale* and *A. centrale* in South Africa. **Veterinary Science**, Switzerland, v. 26, p. 12, 2018.

JAIMES-DUEÑEZ, J.; TRIANA-CHÁVEZ, O.; MEJÍA-JARAMILLO, A. M. Spatial-temporal and phylogeographic characterization of *Trypanosoma* spp. in cattle (*Bos taurus*) and buffaloes (*Bubalus bubalis*) reveals transmission dynamics of these parasites in Colombia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 249, p. 30-42, 2018.

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

KOCAN, K. M. Development of *Anaplasma marginale* in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. In: SAUER, J. R.; HAIR, J. A. (Ed.). **Morphology, physiology and behavioral ecology of ticks**. England: Ellis Horwood Ltd., p. 472–505, 1986.

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

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

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

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

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.

KURAMAE-IZIOKA, E. E. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colleto trichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. **Revista Unimar**, Maringá, v.19, n. 3, p. 683-689, 1997.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1977.

LAURING, A. S; ANDINO, R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruse. **Plos Pathogens**, St. Francisco, v. 6, n. 7, p. 1001-1005, 2010.

LEW, A. E.; BOCK, R. E.; MINCHIN, C. M.; MASAHA, S. A *msp1 α* polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 4, p. 325–335, 2002.

LI, Y.; HAN, M. Q.; LIN, F.; TEN, Y.; LIN, J.; ZHU, D. H. Soil chemical properties, 'Guanximiyou' pummelo leaf mineral nutrient status and fruit quality in the southern region of Fujian province, China. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 15, n. 3, p. 615–628, 2015.

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

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.; MÜLLER, E. Frequência de anticorpos contra *Babesia* em Veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*) no Pantanal e no Parque das Emas. **FNMA**, Brasília, p. 124-132, 2006.

MACHADO, R. Z.; SILVA, J. B.; ANDRÉ, M. R.; GONÇALVES, L. R.; MATOS, C. A., OBREGÓN, D. Outbreak of anaplasmosis associated with the presence of different *Anaplasma marginale* strains in dairy cattle in the states of São Paulo and Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, São Paulo, v. 24, p. 483-46, 2015.

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 *Anaplasmatataceae* agentes infecting the African buffalo *Syncerus caffer* from Marromeu Reserve in Mozambique. **Parasites & Vectors**, London, v. 9, p. 454-462, 2017.

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

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

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Produtos orgânicos: o olho do consumidor.** Brasília, DF: MAPA/ACS, 2012. 34 p.

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

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

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

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

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

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

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

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

PALMER, G.H.; RURANGIRWA, F.R.; MCELWAIN, T.F. Strain composition of the Ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a

mammalian reservoir for tick transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.2, p.631–635, 2001.

PALMER, G.H.; KNOWLES JR., D.P.; RODRIGUEZ, J.L.; GNAD, D.P.; HOLLIS, L.C.; MARSTON, T.; BRAYTON, K.A. Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n.7, p.5381–5384, 2004.

PALMER, G. H.; BANKHEAD, T.; LUKEHART, S. A. Nothing is permanent but change-antigenic variation in persistent bacterial pathogens. **Cell Microb**, v.11, p.1697-1705, 2009.

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

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

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

RAMOS, V. N.; PIOVEZAN, U.; FRANCO, A. H. A. Nellore cattle (*Bos indicus*) and ticks within the Brazilian Pantanal: ecological relationships. **Exp Appl Acarol**. v.68, p. 227, 2016.

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

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

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

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

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

SACCHI, A.B.; DUARTE, J.M.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmatataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocercus dichotomus*). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 35, p.325-334, 2012.

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

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

SCOLES, G.A.; UETI, M.W.; PALMER, G.H. Variation among geographically separated populations of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) in midgut susceptibility to *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmatataceae). **Journal of Medical Entomology**, v.42, p.153-162, 2008.

SILVA, J. B.; FONSECA, A. H.; BARBOSA, J. D.; CABEZAS-CRUZ. Low genetic diversity associated with low prevalence of *Anaplasma marginale* in water buffalo in Marajó Island, Brazil. **Ticks Tick Borne**. v.5, p.801-4, 2014a.

SILVA, J. B.; CABEZAS-CRUZ, A.; FONSECA, A. H.; BARBOSA, J. D.; DE LA FUENTE, J. Infection of water buffalo in Rio de Janeiro Brazil with *Anaplasma marginale* strains also reported in cattle. **Vet Parasitol**, v.205, p.730–734, 2014b.

J.B. SILVA, J.B.; CASTRO, G.N.S.; FONSECA, A.H. Longitudinal study of risk factors for anaplasmosis and transplacental transmission in herd cattle. **Ci. Agrárias**, v.35, p.2491-2500, 2014c.

SILVA, J. B.; GONÇALVES, L. R.; VARANI, A. M.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* studied longitudinally under natural transmission conditions in Rio de Janeiro, Brazil. **Ticks Tick-borne Dis**, v.7, p.270-275, 2015

SILVA, J. B.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. 2016. Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. **Ticks Tick-borne Dis**, v. 7, p.20-25, 2016.

SMITH, T.; KILBORNE, F.L. Investigation into the nature causation and prevention of Texas or Southern cattle fever. Washington: USDA, 1883. 301 p. (USDA. Bulletin, 1).

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

STEVENSON, M. Palmerston North IVABS. **An Int Vet Epid**, p.109, 2008.

STOVER, B.C.; MULLER, K.F. TreeGraph2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, v.11, p.1-9, 2010.

TATE, R. L.; PERDICES, M.; ROSENKOETTER, U.; WAKIM, D.; GODBEE, K.; TOGHER, L.; MCDONALD, S. Revision of a method quality rating scale for single-case experimental designs and *N*-of-1 trials: The 15-item Risk of Bias in *N*-of-1 Trials (RoBiNT) Scale. **Neuropsychological Rehabilitation**, v. 23, p.619–638, 2013.

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

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

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity search tool. **Nucleic Acids Res**, v. 215, p.403-410, 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 Res**, v.44, p.232-235, 2016.

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

VIDOTTO, O.; YAMAMURA, M.H.; ANDRADE, G.M.; BARBOSA, C.S.; FREIRE, R.L.; VIDOTTO, M.C. Ocorrência de *Babesia bigemina*, *B. bovis*, e *Anaplasma marginale* em rebanhos de bovinos leiteiros da região de Londrina, PR. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.4, n.2, p.184, 1995.

VIDOTTO, M.C.; KANO, F.S.; GREGORI, F.; VIDOTTO, O. Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Paraná State, Brazil, using the

msp1α and *msp4* genes. **Journal of Veterinary Medicine**. B, Berlin, v.53, n.9, p.404-411, 2006.

VIDOTTO, M.C.; VIDOTTO, O.; ANDRADE, G.M.; PALMER, G.; MCELWAIN, T.; KNOWLES, D.P. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in cattle in Paraná State, Brazil, by *msp5*, competitive ELISA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.849, p.424-426, 2004.

VIDOTTO, M.C.; KANO, F.S.; GREGORI, F. Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Paraná State Brazil, using the *msp1α* and *msp4* genes. **J. Vet. Med. B Infect**, v. 53, p.404-411, 2006.

ZAMANTUNGWA, T. H. K.; CATANESE, H. N.; LIESCHING, N.; PAIDASHE, H.; COLLINS, N. E.; CHAISI, M. E.; GEBREMEDHIN, A. H.; OOSTHUIZEN, M. C.; BRAYTON, K. A. Characterization of *Anaplasma marginale* subsp. *centrale* Strains by Use of *msp1α* Genotyping Reveals a Wildlife Reservoir. **Journal of Clinical Microbiol**, v. 54, p.2503-2512, 2016.

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

YBAÑEZ, A.P.; TAGAWA, M.; MATSUMOTO, K.; KISHIMOTO, T.; YOKOYAMA, N.; INOKUMA, K. Specific molecular detection of *Anaplasma* sp. closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in Ixodid ticks and cattle in a pastureland in Hokkaido, Japan. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v.13, n.1, p. 6-11, 2012.

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