

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

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Anaplasma marginale* EM
BOVINOS AMOSTRADOS EM ITÚ, ESTADO DE SÃO
PAULO**

Amanda Barbosa Garcia

Bióloga

2020

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

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Anaplasma marginale* EM
BOVINOS AMOSTRADOS EM ITÚ, ESTADO DE SÃO
PAULO**

Amanda Barbosa Garcia

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

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

G216d

Garcia, Amanda Barbosa

Diversidade genética de *Anaplasma marginale* em bovinos amostrados em Itú, estado de São Paulo / Amanda Barbosa Garcia. -- Jaboticabal, 2020

75 p. : il., tabs., mapas + 1 CD-ROM

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Rosangela Zacarias Machado

1. Diversidade genética. 2. Bovinos Infecções. 3. Microbiologia. 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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

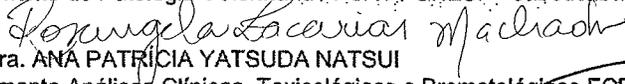
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Anaplasma marginale* EM BOVINOS AMOSTRADOS EM ITÚ, ESTADO DE SÃO PAULO

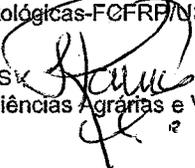
AUTORA: AMANDA BARBOSA GARCIA

ORIENTADORA: ROSANGELA ZACARIAS MACHADO

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


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


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


Pós-doutoranda INALDA ANGELICA DE SOUZA RAMOS
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP

Jaboticabal, 08 de abril de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

AMANDA BARBOSA GARCIA – nascida em 29 de maio de 1995 no município de Ribeirão Preto, São Paulo. Em 2014 ingressou no curso de graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal, obtendo o título de bacharela, com ênfase em Fauna, em fevereiro 2018. Durante a graduação, foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), na modalidade Iniciação Científica, no período de maio de 2015 a abril de 2016 sob a orientação da Profª Drª Silvana Martinez Baraldi Artoni, na área de anatomia e fisiologia de animais de produção. Em abril de 2016 ingressou no laboratório de Imunoparasitologia sob orientação do Prof. Dr. Marcos Rogério André, onde foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), na modalidade Treinamento Técnico I, no período de maio de 2016 a novembro de 2016, na área de Patologia animal. Em março de 2018, a aluna ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária (FCAV – UNESP) sob a orientação da Profª Drª Rosangela Zacarias Machado, com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar aos meus pais, Rita Barbosa e Edmilson Garcia, à minha avó paterna Marilene e à minha madrinha Maria José, por todo o apoio pessoal, e as vezes financeiro, e por sempre acreditarem em mim, sem nunca duvidar de que eu seria capaz. Vocês nunca me abandonaram, muito obrigada por tudo.

Ao meu companheiro de vida, Felipe Matos, por estar do meu lado em mais uma etapa acadêmica, obrigada pelo amor até nas horas mais adversas, você me faz forte.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Rosangela Zacarias Machado, por toda a ajuda, incentivo, ensinamentos, conselhos, por acreditar que eu era capaz de concluir este trabalho e por compartilhar sua paixão pela Parasitologia comigo, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Marcos Rogério André, por estar sempre presente, me ajudando, me incentivando e me guiando em várias etapas deste trabalho.

À todas as funcionárias da Imunodot Diagnósticos, principalmente à Márcia Jusi e Carla Freschi, por toda a paciência, a ajuda e os conhecimentos, muito obrigada por dividirem o espaço de trabalho de vocês comigo.

À Inalda Angélica Souza Ramos pela ajuda na análise das amostras e por me ensinar muito sobre o *Anaplasma*. Aos demais amigos de laboratório: Renan Amaral, Lívia Perles, Priscila Ikeda, Luiz Ricardo Gonçalves, Ana Cláudia Calchi, Leidiane Lima, Mariele de Santi, Jaqueline Camargo, Ana Carolina Santiago, pela ajuda, parceria e amizade.

À Maria Eduarda Furquim e Victória Valente, por tudo que compartilhamos até aqui, a amizade de vocês me deixa extremamente feliz, sou muito grata.

Ao meu grande amigo Andrei Itajahy, pela ajuda desde a prova do mestrado até a última etapa dele, você é uma inspiração pra mim.

Às minhas amigas Iashilei Pasquini e Gabriella Cavazzini, parceiras de mestrado, obrigada por todos os trabalhos, conselhos palavras de apoio durante estes dois anos.

Aos meus amigos que estão comigo desde a graduação, em especial: Juliana Lemes, Gustavo Moraes, Amanda Rosa, Murilo Garavelo e Fernanda Salti, vocês fizeram toda a diferença nesta etapa da minha vida, obrigada por tanto.

A bateria universitária da Unesp Jaboticabal, Batuka, por ser o meu refúgio, por me trazer tanta alegria, por me ensinar a amar o samba e a fazer parte dele.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Veterinária, principalmente à Mabel Mastro Custódio e Rafaela Beraldo, que me ajudaram muito, em qualquer coisa que eu solicitasse, sou muito grata.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo 2018/05366-7) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Processo 401403/2016-5) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização do presente trabalho.

À Coordenação do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária e a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 O gênero Anaplasma	3
2.2 Enfermidades causadas pelo gênero Anaplasma	3
2.3 Anaplasmosse bovina ao redor do mundo.....	4
2.4 Transmissão de <i>A. marginale</i>	6
2.5 O artrópode vetor	8
2.6 Anaplasmosse no Brasil	8
2.7 Diversidade Genética de <i>A. marginale</i>	11
2.8 Susceptibilidade à <i>A. marginale</i>	14
2.9 Tratamentos e vacinas para Anaplasmosse	15
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Colheitas das amostras.....	19
4.2 Volume globular	20
4.3 Extração de DNA	20
4.4 Reação de Amplificação para o gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (<i>gapdh</i>).	21
4.5 PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>) ..	21
4.6 PCR convencional para <i>A. marginale</i> baseada no gene <i>msp1α</i>	22
4.7 Eletroforese em gel de agarose	23
4.8 Reações de Clonagem.....	23
4.8.1 Reação de ligação do produto amplificado com o vetor pGEM-T Easy	23
4.8.2 Transformação das células competentes de <i>Escherichia coli</i> One Shot Match 1 TM T1 ^R	23
4.8.3 Minipreparação do DNA plasmidial.....	24

4.8.4 PCR convencional para confirmação da presença do inserto-alvo.....	24
4.9 Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados.....	25
4.10. Análise das sequências	25
4.10.1 Análise das sequências Consenso baseadas no gene <i>m</i> sp1 α	25
4.10.2 Classificação de genótipos de <i>A. marginale</i> e identificação da diversidade genética	25
4.10.3 Análises filogenéticas	26
4.11 Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA)	27
5. RESULTADOS.....	28
5.1. Volume globular	28
5.2. Análises moleculares	28
5.2.1 Ensaios de qPCR para <i>A. marginale</i> baseados no gene <i>m</i> sp1 β	28
5.2.2 Ensaios de cPCR para <i>A. marginale</i> baseados no gene <i>m</i> sp1 α e análise de identidade das sequências obtidas pelo BLASTn.....	29
5.2.3 Análise de diversidade genética de <i>A. marginale</i> baseada no gene <i>m</i> sp1 α	29
5.2.4 Inferência Filogenética.....	38
5.3. Soropositividade para <i>A. marginale</i> pelo Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)	42
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES.....	49
8. REFERÊNCIAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida de *A. marginale* em bovinos..... p. 7
- Figura 2.** Cidade de Itú, localizada no estado de São Paulo, sudeste brasileiro, com as seguintes coordenadas: Latitude: 23° 15' 57" Sul, Longitude: 47° 17' 57" Oeste..... p. 20
- Figura 3.** Número de ocorrência de cada repetição em *tandem* encontrada no gene *msp1α* de estirpes de *A. marginale* em bovinos de corte numa fazenda situada em Itú, estado de São Paulo..... p. 36
- Figura 4.** Número de repetições em *tandem* do gene *msp1α* e seu tamanho (número de aminoácidos) encontrado em estirpes de *A. marginale* em bovinos de corte numa fazenda situada em Itú, estado de São Paulo..... p. 37
- Figura 5.** Correlação entre o número de genótipos e o número de repetições encontradas em estirpes de *A. marginale* em bovinos de corte numa fazenda situada em Itú, estado de São Paulo..... p. 38
- Figura 6.** Árvore filogenética com sequências do gene *msp1α* de *A. marginale*. A árvore foi construída utilizando o método probabilístico de Máxima Verossimilhança (MV) e modelo evolutivo TN+F+G4 com sequências de *A. marginale* detectadas em bovinos de corte proveniente de uma fazenda na cidade de Itú, estado de São Paulo. Estão apresentadas sequências de *A. marginale* de outros países e de estados brasileiros. Os números de acesso no GenBank estão apresentados ao lado das sequências, entre parênteses. Os clusters contendo as sequências do presente estudo foram divididos numericamente, seguindo a ordem de posicionamento dos demais clusters. p. 41
- Figura 7.** Mapa com estudos conduzidos no Brasil com a classificação de genótipos segundo Estrada-Peña et al. (2009). p. 45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Caracterização dos genótipos e estirpes das amostras positivas para o gene *msp1 α* de *A. marginale*, com número do animal, identificação da coleta, estimativa da riquetsemia por qPCR absoluta e distribuição geográfica, de acordo com o banco de dados do *RepeatAnalyzer*..... p. 30
- Tabela 2.** Identificação dos genótipos segundo Estrada-Peña et al. (2009) nos bovinos de corte situados em uma fazenda no município de Itú, estado de São Paulo..... p. 33
- Tabela 3.** Caracterização das estirpes das 12 amostras clonadas para o gene *msp1 α* de *A. marginale*, com identificação dos animais, colheita e estirpe de cada clone..... p. 34
- Tabela 4.** Índices métricos de diversidade genética do gene *msp1 α* de *A. marginale* encontrados em gado de corte de uma fazenda situada na cidade de Itú, estado de São Paulo, comparativamente aos índices encontrados em outros estados brasileiros (São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Pará (búfalos), Goiás e Mato Grosso do Sul), assim como os valores para o Brasil e o mundo, segundo o Software *Repeat Analyzer*... p. 35
- Tabela 5.** Distribuição dos animais soropositivos na pesquisa de anticorpos IgG anti *Anaplasma marginale* usando antígeno total e a proteína recombinante de superfície MSP5 e a quantificação média no ensaio de qPCR por colheita..... p. 42

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Anaplasma marginale* EM BOVINOS AMOSTRADOS EM ITÚ, ESTADO DE SÃO PAULO

RESUMO - *Anaplasma marginale* é uma bactéria, Gram negativa, intracelular obrigatória parasita de eritrócitos e o principal agente da Anaplasmosse bovina. Esta doença causa anemia severa, provocando a redução do ganho de peso e da produção de leite e gerando grandes perdas econômicas na pecuária mundial. A diversidade genética desta bactéria vem sendo caracterizada com base na sequência das proteínas de superfície (MSPs), principalmente, na proteína MSP1 α , sendo possível identificar as diferentes estirpes geográficas de acordo com as diferenças nas sequências de aminoácidos. O presente estudo teve como objetivo investigar a diversidade genética de *A. marginale* em bovinos de corte da raça Angus naturalmente infectados durante um surto da enfermidade. Vinte bovinos, com idades entre 6 e 9 meses, oriundos de uma fazenda no município de Itú, estado de São Paulo foram acompanhados por quatro meses e quatro colheitas de sangue foram realizadas. Amostras de soro foram submetidas à Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA) para detecção de anticorpos IgG anti-*A. marginale*. As oitenta amostras de sangue total obtidas, foram submetidas à extração de DNA, PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para o gene *msp1 β* , semi-nested PCR (snPCR) para o gene *msp1 α* , clonagem do fragmento alvo e sequenciamento pelo método de Sanger. As sequências obtidas foram submetidas à análises de diversidade genética pelo software *RepeatAnalyzer*. O ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA), utilizando Ag total, revelou baixa soroprevalência (22,5%) nos animais amostrados apesar de 100% de positividade na qPCR, com quantificação entre 10³ e 10⁷ número de cópias de DNA/ μ L, mostrando uma possível imunossupressão causada pela presença do patógeno. Na snPCR, baseada no gene *msp1 α* , 57,5% (46/80) das amostras mostraram-se positivas. A análise de microssatélites de 36 sequências obtidas mostrou a presença do genótipo H (58,3%), F (25%), E (19,4%), C (2,7%) e G (2,7%). Através do programa *Repeat Analyzer* foram identificadas várias estirpes na região estudada, algumas delas nunca antes descritas na literatura, como 13 27 13 27 13 F; 16 F F; T 27; 63 29 104 29; LJ1 13 LJ1 13; 16 F 17; 16 F 91 entre outras. Foi encontrada alta diversidade genética da bactéria *A. marginale* circulando nos animais estudados, identificando mais de uma estirpe circulante em um mesmo animal.

Palavras-chave: Anaplasmosse bovina, Diversidade genética, Genótipo, MSP1 α

GENETIC DIVERSITY OF *Anaplasma marginale* IN BOVINES SAMPLED IN ITÚ, STATE OF SÃO PAULO

ABSTRACT - *Anaplasma marginale* is a Gram-negative, obligatory intracellular erythrocyte parasite and the main agent of bovine Anaplasmosis. This disease causes severe anemia, causing a reduction in weight gain and milk production and generating major economic losses in livestock worldwide. The genetic diversity of this bacterium has been characterized based on the sequence of surface proteins (MSPs), mainly in the protein MSP1 α , making it possible to identify the different geographical strains according to the differences in the amino acid sequences. The present study aimed to investigate the genetic diversity of *A. marginale* in Angus beef cattle naturally infected during an outbreak of the disease. Twenty cattle, aged 6 to 9 months, from a farm in the city of Itú, state of São Paulo, were followed for four months and four blood samples were taken. Serum samples were subjected to the Indirect Immunoenzymatic Assay (iELISA) to detect antibodies IgG anti-*A. marginale*. The eighty whole blood samples obtained were subjected to DNA extraction, quantitative real-time PCR (qPCR) for the *msp1 β* gene, semi-nested PCR (snPCR) for the *msp1 α* gene, cloning of the target fragment and sequencing by the Sanger method. The obtained sequences were subjected to genetic diversity analysis using the *RepeatAnalyzer* software. The Indirect Immunoenzymatic assay (iELISA) revealed low seroprevalence in the sampled animals despite 100% positivity in the qPCR, with quantification between 10^3 and 10^7 number of DNA copies/ μ L, showing a possible immunosuppression caused by the presence of the pathogen. In snPCR, based on the *msp1 α* gene, 57.5% (46/80) of the samples were positive. Microsatellite analysis of 36 sequences obtained showed the presence of genotype H (58.3%), F (25%), E (19.4%), C (2.7%) and G (2.7%). Through the *RepeatAnalyzer* software, several strains were identified in the studied region, some of them never before described in the literature, such as 13 27 13 27 13 F; 16 F F; T 27; 63 29 104 29; LJ1 13 LJ1 13; 16 F 17; 16 F 91 among others. High genetic diversity of *A. marginale* bacteria was found circulating in the animals studied, identifying more than one circulating strain in the same animal.

Keywords: Bovine anaplasmosis, Genetic diversity, genotype, MSP1 α

1. INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Anaplasma* são alfa-proteobactérias, Gram negativas, pertencentes à família Anaplasmataceae. Estes microrganismos são intracelulares obrigatórios de eritrócitos (KOCAN et al., 2010). Este gênero apresenta grande importância veterinária e na medicina por ter agentes causadores de doenças, como a anaplasmoose granulocítica humana, causada pela espécie *Anaplasma phagocytophilum* (WOLDEHIWET, 2010) e a anaplasmoose bovina, causada pela bactéria *Anaplasma marginale*, que atinge grande parte do rebanho bovino do Brasil, sendo uma enfermidade que gera muitas perdas econômicas. A transmissão desta bactéria é feita através de carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus*, que são seus vetores biológicos, mas também pode ocorrer transmissão mecânica por moscas dos gêneros *Tabanus* e *Stomoxys* e, ainda, fômites contaminados. (KOCAN et al., 2004)

A anaplasmoose bovina ocorre em áreas tropicais e subtropicais e é uma das principais causas de redução na produção de carne e de leite nos bovinos em todo o mundo. No Brasil, a enfermidade é considerada endêmica, causando uma parasitemia persistente em bovinos de corte e de leite de todas as idades (CANGUSSU et al., 2018). Os ruminantes selvagens e domésticos podem desempenhar o papel de hospedeiros vertebrados para as anaplasmoses transmitidas por artrópodes, em especial, os carrapatos. (MACHADO et al., 2016). O Brasil é portador do segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças. Além disso, desde 2004, assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e exportação para mais de 180 países (MAPA 2014). 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.

O *A. marginale* possui uma diversidade de estirpes que dificultam o controle da doença. Tal diversidade genética vem sendo caracterizada com base na sequência das proteínas de superfície (MSPs), constituindo-se o principal foco para o desenvolvimento de vacinas (PALMER et al., 1999). Seis proteínas principais de

superfície (MSP1 α , MSP1 β , MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5) foram inicialmente estudadas. Essas proteínas, expostas na superfície da bactéria, são facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro, desempenhando importantes funções para a sobrevivência do parasita (ARULKANTHAN et al., 1999).

Os tratamentos disponíveis no mercado são os medicamentos, como as tetraciclínas, as fluoroquinolonas e o dipropionato de imidocarb, que, a princípio, atuam bem contra a anaplasmoze aguda, mas não evitam que uma infecção persistente se instale no animal (COETZEE et al., 2005). A infecção persistente permite que novos animais possam ser infectados através dos artrópodes vetores que circulam entre o animal parasitado e o sadio e por fômites contaminados, como agulhas reutilizadas. (KOCAN et al., 2003; 2004)

Trabalhos sugerem uma nova maneira de imunização do gado, como vacinas recombinantes baseadas em proteínas de superfície do *A. marginale*, para evitar a infecção por anaplasmoze bovina (CROSBY et al., 2015; DERINGER et al., 2017; CANGUSSU et al., 2018). O desafio para a produção de uma vacina eficaz contra a doença é a existência de diversas variantes da bactéria, devido às mutações nas proteínas de superfície (DE LA FUENTE et al., 2010).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Anaplasma*

Anaplasma marginale é uma alfa-proteobactéria, intracelular, parasita obrigatória de eritrócitos pertencente à família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales. Theiler et al. (1910) constatou que a enfermidade causada pelo *A. marginale* era distinta da doença intitulada de babesiose e ambas podiam parasitar os animais. Baseando-se nos trabalhos do mesmo autor, logo ficou claro que esta bactéria distribuía-se nas áreas tropicais e subtropicais, sendo descrita pela primeira vez nos Estados Unidos por Darlington (1926). No Brasil, o primeiro registro da bactéria foi feito por Carini em 1910 (CARINI, 1910).

O gênero *Anaplasma* foi reclassificado por Dumler et al. (2001), que observou a formação de quatro grupos geneticamente distintos. As múltiplas análises e alinhamentos do gene *16S rRNA* e a confirmação através de comparações com o gene *groESL* revelou tais grupos, sendo eles: *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Ehrlichia* e *Wolbachia*, com 96,1%, 94,4%, 97,7% e 95,6% de similaridade, respectivamente (DUMLER et al., 2001).

2.2 Enfermidades causadas pelo gênero *Anaplasma*

A anaplasmosose é uma doença transmitida biologicamente por carrapatos, que atinge diferentes hospedeiros, dependendo da espécie dentro do gênero *Anaplasma*. Entre os agentes etiológicos estão o *A. marginale*, *A. platys*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum* (DUMLER et al., 2001; RAR E GOLOVLJOVA, 2011).

Dentre as enfermidades destaca-se a anaplasmosose granulocítica, causada pelo *A. phagocytophilum*, em diversas espécies como humanos, cachorros, cavalos, cabras, ovelhas e também alguns gatos (STUEN et al., 2013). Esta doença, em humanos, possui diferentes graus de distribuição ao redor do mundo: na Europa é considerada rara, com poucos casos relatados, enquanto nos Estados Unidos é considerada emergente e de grande importância na saúde pública (SEO et al., 2018). Em ruminantes domésticos o *A. phagocytophilum* causa a “febre do

carrapato”, chamada em inglês de “*tick-borne-fever*” (TBF) cujos sintomas incluem febre alta e anorexia, além de queda na produção de leite (STUEN et al., 2013).

A anaplasmose bovina tem como agente etiológico o *A. marginale*. Esta bactéria faz parte do complexo de enfermidades chamada de Tristeza Parasitária Bovina (TPB), que ainda conta com a *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (FONSECA E BRAGA, 1924; MASSARD E FREIRE, 1985). O Brasil, país onde a endemia se faz presente, é portador do segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 172 milhões de cabeças (CENSO AGROPECUÁRIO, 2017) enfrenta problemas com a anaplasmose bovina, tendo relato em praticamente todas as regiões do país.

A. marginale causa diversos sinais clínicos, no animal parasitado, como febre, perda de peso, aborto, letargia, icterícia e, muitas vezes, morte dos animais mais velhos do que 2 anos (KOCAN et al., 2003). Sendo assim, esta bactéria é uma das principais causas da redução na produção de carne bovina e de produção de leite mundial (KOCAN et al., 2010; AUBRY E GEALE, 2011)

2.3 Anaplasmose bovina ao redor do mundo

A anaplasmose bovina afeta animais presentes em regiões tropicais e subtropicais. É considerada endêmica nos estados do Atlântico Sul, estados costeiros e vários estados no Centro-Oeste e Oeste dos Estados Unidos (MCCALLON et al., 1973). Porém, devido ao transporte de gado e às formas de transmissão, a doença já foi identificada em praticamente todos os estados do país (KOCAN et al, 2010).

No México, na América do Sul, na América Central e em algumas regiões da África e Ásia a enfermidade também é considerada endêmica, com variações de soroprevalência frente à bactéria. Na Europa, o parasita é mais encontrado em países Mediterrâneos com a associação entre bovinos e espécies selvagens (DE LA FUENTE et al., 2005; KOCAN et al., 2010)

A busca por *A. marginale* em animais selvagens também se faz necessária, uma vez que estes animais possam ter contato com rebanhos domésticos. Tendo isto em vista, Machado et al. (2016) conduziram estudo em Moçambique com 97 amostras de sangue total de búfalos da espécie *Syncerus caffer*. Pela qPCR,

baseada no gene *msp1β*, setenta amostras mostraram positividade, com parasitemia variando entre 10^0 a 10^5 cópias do fragmento alvo/ μ l de DNA. Dentre estes 70 animais, sessenta e cinco foram positivos frente à técnica de PCR convencional para o gene *msp5*. O estudo também buscou identificar outras espécies do gênero *Anaplasma* no sangue dos animais, concluindo que os búfalos desta região da África mostraram estar parasitados, simultaneamente, por diferentes espécies de *Anaplasma*, sendo elas *A. marginale*, *A. centrale* e *A. phagocytophilum*, sendo este o primeiro estudo a diagnosticar *Anaplasma spp.* em búfalos desta região (MACHADO et al., 2016).

Buscando identificar a presença de *A. marginale* em dois estados na Índia, 965 amostras sanguíneas provenientes de rebanho bovino foram submetidas à PCR convencional para o gene conservado *msp4*. A prevalência da bactéria foi de 16,4% nos dois estados amostrados. Vinte e quatro amostras foram clonadas tendo como gene alvo o *msp4*, e o resultado obtido mostrou diversidade genética entre as estirpes, que se posicionaram filogeneticamente próximas a estirpes encontradas no Brasil, México, Hungria, Zimbábue e Príco. Esta diversidade pode ser explicada por uma pressão evolutiva ou por migrações de estirpes entre as regiões (GEORGE et al., 2017).

No estudo conduzido na África do sul, por Hove et al. (2018), foram colhidas 517 amostras sanguíneas de bovinos de raças mistas provenientes das nove províncias do país. Fazendo uso da técnica de Sequenciamento de nova geração baseada no gene *msp1β* foi possível identificar as variantes de *A. marginale* para o referido gene. Os autores também submeteram as amostras à técnica de snPCR para o gene *msp1α* e clonagem deste fragmento alvo. Como resultados, foram identificadas 36 novas repetições baseadas no gene *msp1α*, mostrando que há uma alta diversidade genética da bactéria, com alguns genótipos de *msp1α* amplamente distribuídos pelo país e outros que aparecem apenas uma vez em cada província (HOVE et al., 2018)

Em Moçambique, estudo de Jesus Fernandes et al. (2019) objetivou investigar a ocorrência de espécies de *Anaplasma* em bovinos amostrados em cinco diferentes distritos do país. Através de ensaios de PCR convencional para os genes *msp4*, *msp5*, *16SRNA* e *groEL* foi possível identificar as espécies, sendo elas *A.*

platys, *A. phagocytophilum*, 'Candidatus *Anaplasma boleense*, *A. ovis* e *A. centrale*. Através de análises filogenéticas baseadas nos genes *msp4* e *msp5*, as sequências obtidas se posicionaram no clado de *A. marginale*, com evidência de ocorrência de 8 e 5 haplótipos diferentes para cada gene, respectivamente (DE JESUS FERNANDES et al., 2019)

2.4 Transmissão de *A. marginale*

A transmissão de *A. marginale* para o bovino pode se dar biologicamente por carrapatos, por moscas de forma mecânica, por via transplacentária e ainda por fômites contaminados, como agulhas, seringas e outros utensílios. Já foram descritas 20 espécies de carrapatos como vetores no mundo (KOCAN et al., 2010). O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é considerado um vetor biológico importante para a transmissão da bactéria, que pode ser transmitida de estágio para estágio (interestadial ou transstadial) ou dentro do mesmo estágio (intrastadial). Já a transmissão transovariana entre carrapatos não foi observada até o presente momento (STICH et al., 1989; KOCAN et al., 2010). A infecção se dá quando o carrapato efetua o repasto sanguíneo entre os bovinos, ingerindo eritrócitos parasitados pela bactéria. Dentro do vetor, o *A. marginale* se instala nas células intestinais, aonde irá se desenvolver e, em seguida, migrar para outros tecidos, como a glândula salivar. Na glândula salivar do carrapato a bactéria forma colônias que podem conter centenas de organismos, que se reproduzem por divisão binária. A primeira forma do *A. marginale* dentro destas colônias é chamada de corpúsculos reticulados (forma vegetativa). Em seguida a forma reticulada se transforma nos corpúsculos densos, que é a forma infectante da bactéria e pode sobreviver fora das células do hospedeiro por um certo período de tempo. (KOCAN et al., 2010).

A transmissão da bactéria por via mecânica também já foi observada sendo feita por moscas do gênero *Stomoxys* e *Tabanus* (EWING, 1981; FOIL, 1989; POTGIETER, 1979; SCOLES et al., 2005) ou fômites contaminados com os corpúsculos densos, como agulhas com sangue infectados, dispositivos de identificação auricular e instrumentos de castração (KOCAN et al., 2010).

A transmissão por via transplacentária já foi descrita em trabalhos como o de Silva et al. (2015) e Silva et al. (2016), onde bezerros recém nascidos foram identificados como positivos para *A. marginale*.

O período de incubação nos bovinos pode variar de 7 a 60 dias, tendo em média 28 dias, dependendo da quantidade de bactéria inoculada no animal. Dentro da corrente sanguínea do bovino, *A. marginale* invade os eritrócitos e se multiplica em seu interior, assim o número do parasita cresce geometricamente. Durante a infecção, os eritrócitos infectados são fagocitados pelo Sistema Mononuclear Fagocitário, resultando em uma queda de eritrócitos circulantes, levando a uma anemia que pode variar de leve a grave (RISTIC, 1977).

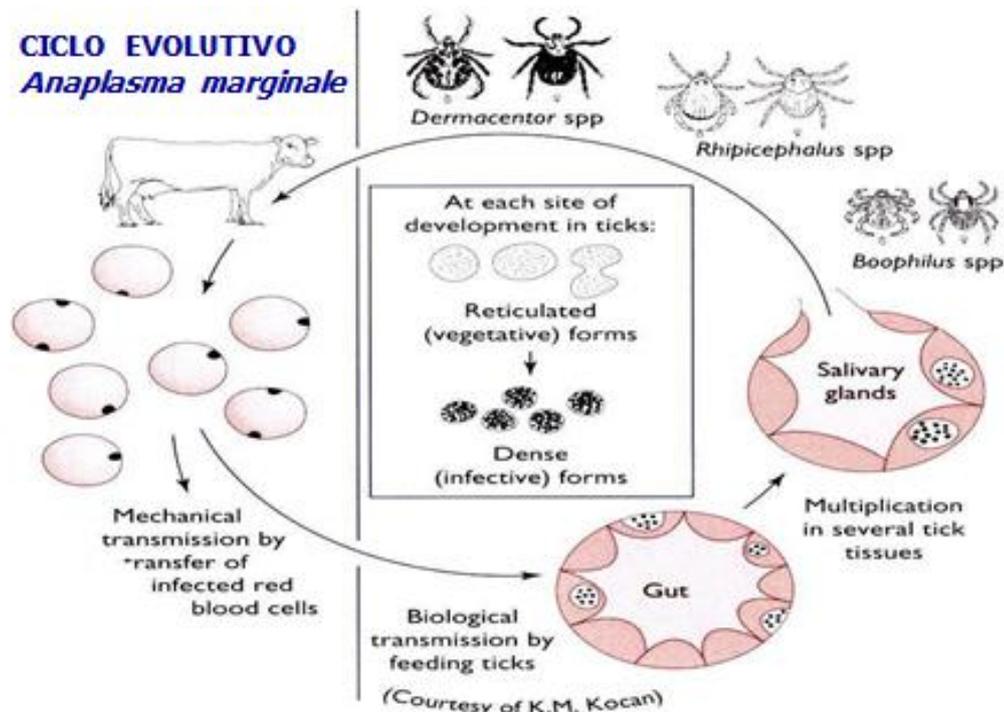


Figura 1. Ciclo de vida de *A. marginale* em bovinos. (Cortesia de Katherine M Kocan).

2.5 O artrópode vetor

A anaplasmose bovina é transmitida biologicamente por carrapatos ixodídeos, sendo o mais importante o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, (“carrapato-do-boi”). Este artrópode inicialmente vivia apenas na Índia e Indonésia parasitando bovinos da Ásia (OSTERKAMP et al., 1999; BARRÉ E UILENBERG, 2010) porém, devido ao transporte de animais e as condições favoráveis dos climas tropicais e subtropicais esta espécie espalhou-se por todo o mundo dando início a pragas de difícil controle. Introduções frequentes de raças europeias de gado *Bos taurus* nestas áreas facilitaram tais invasões, devido ao fato de esta espécie de bovino não apresentar resposta imune eficiente contra o *R. microplus* (FRISCH, 1999; CHEVILLON et al., 2012).

Frequentemente controlada por carrapaticidas, as populações de *R. microplus* rapidamente buscaram novas formas de se adaptar, parasitando, com sucesso hospedeiros não pertencentes a família Bovidae (LABRUNA et al. 2001; BATTSETSEG et al. 2002) e se tornando resistentes, ao longo de suas gerações, aos componentes químicos dos carrapaticidas encontrados no mercado (CHEVILLON et al., 2012).

A distribuição geográfica atual desta espécie de carrapato encontra-se em países da Ásia, na Austrália, Ilhas do Pacífico, Madagascar e Ilhas do Oceano Índico, Américas Central e do Sul, além de partes do sul e sudeste da África (BARRÉ E UILENBERG 2010). É importante ressaltar que novas introduções em novas áreas geográficas continuam ocorrendo, tal como a introdução acidental de *R. microplus* na África Ocidental em 2006 (MADDER et al. 2007).

2.6 Anaplasmose no Brasil

No Brasil o gênero *Anaplasma* se mostra bastante frequente devido ao clima tropical do país. A anaplasmose bovina é considerada endêmica e a pecuária, uma das frações mais importantes na economia do país, sofre pela alta ocorrência da doença (VIDOTTO et al., 1999). Sendo assim, não são raros os casos de surtos da doença com animais naturalmente infectados.

A prevalência molecular da bactéria nas regiões brasileiras pode variar, sendo de 16,3% na zona semi-árida do estado de Sergipe (OLIVEIRA et al., 1992) e ficando próxima a 100% nos estados da Bahia (ARAÚJO et al., 1995), da Paraíba (MADRUGA et al., 1994), Rio de Janeiro (SILVA et al., 2015), assim como em Minas Gerais (RIBEIRO E REIS, 1981).

Na região Sul, Vidotto et al. (2006), no estado do Paraná, identificaram três estirpes de *A. marginale* provenientes de bovinos de diferentes regiões do estado. Utilizando o gene *msp4* como marcador molecular, foi possível classifica-las como sendo próximas de sequências oriundas dos Estados Unidos, Ásia e de Israel. A proximidade filogenética com sequências de *A. marginale* destes outros países pode ser um indício de que o transporte de animais e a importação de rebanhos é um dos fatores que torna possível introduzir novas estirpes em território brasileiro.

No Pará, Silva et al., (2013) detectaram *A. marginale* em búfalos que conviviam com o gado da região. De acordo com o ensaio de ELISA indireto, 49% dos animais (245/500) foram soropositivos frente à bactéria. Além disso, pela nested PCR (nPCR) baseada no gene *msp5* 5.4% (27/500) dos animais mostraram positividade. Estes resultados mostram que os búfalos da região podem estar vulneráveis a bactéria devido a sua proximidade com bovinos de corte que são hospedeiros com infecção persistente.

Nos estados de São Paulo e de Goiás foram conduzidos estudos por Machado et al., (2015), objetivando detectar diferentes estirpes de *A. marginale* em um surto de anaplasmosse bovina em gado leiteiro. Em cada estado foram coletados 100 amostras de sangue de animais que apresentavam sinais clínicos da doença. Baseados em ensaios de qPCR, nPCR para o gene *msp1 α* e em análises de microssatélites para o mesmo gene foram encontrados 3 diferentes genótipos nos animais da região de Goiás (C, D e E) e 2 genótipos (E e H) nos bovinos de São Paulo. Na qPCR para o gene *msp1 β* 94% do gado de São Paulo mostrou-se positivo, contra 34% dos animais de Goiás. Além da identificação de genótipos, o trabalho também mostrou que há estirpes mais predominantes circulando nestas regiões, que causaram sinais clínicos de anaplasmosse bovina nos animais estudados, são elas T-10-15 e α - β^3 - Γ , sendo a última a mais patogênica e associada com a mortalidade de animais. Vale ressaltar que na cidade de Mambáí (GO), no

local onde os bovinos se encontravam, havia uma grande infestação por moscas, transmitindo a bactéria mecanicamente entre os animais.

Em estudo conduzido na região sudeste, no estado do Rio de Janeiro, Silva et al. (2015) avaliaram 20 bezerros a cada 3 meses durante seu primeiro ano de vida, sob condições naturais de infecção. A parasitemia dos animais variou de 10^3 a 10^{12} cópias de um fragmento do gene *msp1β*/μL de DNA. Apesar destes valores os animais não apresentavam sintomatologia clínica evidente. Este foi o primeiro trabalho a encontrar evidências que comprovam a transmissão transplacentária da doença no Brasil, sendo identificados 3 bezerros que nasceram infectados, com as repetições do gene *msp1α* 4-63-27, 78-242-25-31 e τ-102-15. Também foram encontradas novas estirpes circulantes que, filogeneticamente, se posicionaram próximas a estirpes já identificadas em Israel e Porto Rico. Estes resultados sugerem que estas novas variantes de *A. marginale* podem ser oriundas de mutações recentes sofridas pelas estirpes já existentes (SILVA et al., 2015).

Em São Paulo, Silva et al. (2016) conduziram estudo na cidade de Taiacu com 20 animais proveniente do cruzamento entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Estes bovinos foram avaliados a cada três meses durante o seu primeiro ano de vida. A prevalência da bactéria baseada na qPCR para o gene *msp1β* variou de 10^2 a 10^7 cópias do fragmento alvo/μL de DNA. Os animais também foram soropositivos frente ao *A. marginale* com taxas que variaram de 20% a 80%, aumentando com o passar do tempo. Alguns dos animais apresentavam sintomatologia clínica e também repiques da doença, tendo a necessidade de repetir o tratamento com medicamentos. Neste trabalho os autores encontraram evidências de transmissão transplacentária, em 15% (3/20) dos animais. Uma baixa diversidade genética foi encontrada, apesar da alta soropositividade e da constante presença de moscas e carrapatos.

Sendo o primeiro estudo em bovinos de corte no Pantanal Sulmatogrossense, de Souza-Ramos et al. (2019) observaram uma alta parasitemia nos animais pelos ensaios de qPCR, variando entre 10^3 e 10^6 cópias do gene *msp1β*/μL de sangue. Apesar da presença da bactéria no sangue destes animais, os mesmos não apresentavam sintomatologia clínica, estando com uma infecção persistente e atuando como possíveis focos de novas infecções, transmitidas através do carrapato

vetor. A raça do animal também pode ser um indicativo de maior adaptação. Neste estudo os bovinos eram da raça Nelore, considerada mais adaptada tanto ao clima tropical da região, quanto à infestação por carrapatos.

2.7 Diversidade Genética de *A. marginale*

Uma das estirpes de *A. marginale*, localizada em St. Maries, EUA teve o seu genoma completo codificado e identificou-se 62 proteínas de superfícies e, entre elas, 49 pertencentes à superfamília das MSPs de MSP1 e MSP2 (BRAYTON et al., 2005).

A diversidade genética do *A. marginale* vem sendo caracterizada com base na sequência das proteínas de superfície, constituindo-se o principal foco para o desenvolvimento de vacinas (PALMER et al., 1999). As proteínas MSP1 α , MSP1 β , MSP2 MSP3, MSP4 e MSP5 foram inicialmente identificadas em isolados de *A. marginale* derivados de eritrócitos bovinos e de tecidos de carrapatos. Essas proteínas, expostas na superfície da bactéria, são facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro, desempenhando importantes funções para a sobrevivência do parasita (ARULKANTHAN et al., 1999). Elas estão envolvidas nas interações da bactéria com seus hospedeiros vertebrados e invertebrados (DE LAFUENTE et al., 2001; 2003; 2005; KOCAN et al., 2003; 2004; BRAYTON et al., 2005; KOCAN et al., 2010). A proteína MSP1 α demonstrou ser uma adesina para eritrócitos bovinos e células do carrapato vetor. É no complexo N-terminal desta proteína que se encontra o domínio de adesão, que é indispensável para a invasão de células hospedeiras e transmissão de *A. marginale* (DE LA FUENTE et al., 2001).

As proteínas MSP2 e MSP3 são proteínas imunodominantes no *A. marginale* (VIDOTTO et al., 1994). A MSP2 se encontra em todos os representantes do gênero *Anaplasma* e é codificada por grandes famílias multigênicas polimórficas (PALMER et al., 1998; BRAYTON et al., 2005). As variações antigênicas desta proteína ocorrem durante as infecções persistentes de *A. marginale*, tanto em carrapatos quanto em bovinos (DE LA FUENTE et al., 2001; BRAYTON et al., 2005), desta forma a bactéria consegue enganar o sistema imune do hospedeiro e manter a

persistência da infecção (BATTILANI et al., 2017). Já a MSP3 varia nas propriedades antigênicas (BRAYTON et al., 2005).

Baseada na proteína MSP1 α é possível identificar as diferentes estirpes geográficas de acordo com as diferenças nas sequências de moléculas e aminoácidos (DE LA FUENTE et al., 2007). Enquanto o C-terminal da proteína é altamente conservado, os N-terminais são altamente variáveis, com o número e a sequência de aminoácidos constantes para uma determinada estirpe de *A. marginale* (DE LA FUENTE et al., 2001a; PALMER et al., 2001; ESTRADA-PEÑA et al., 2009). Alguns trabalhos descrevem a diversidade genética desta bactéria baseada nas repetições em tandem da MSP1 α como Ferreira et al. (2001) e Vidotto et al. (2006) no Paraná, de la Fuente et al. (2005) e Pohl et al. (2013) em Minas Gerais e Silva et al. (2015) no Rio de Janeiro. As análises destas repetições em tandem resultaram em diferentes genótipos, nomeados A, B, C, D, E, F, G H e I, seguindo o modelo proposto por Estrada-Penã et al., (2009) onde um microsatélite é localizado na MSP1 α a 5' UTR entre a sequência putativa de Shine-Dalgarno (GTAGG) e o códon de iniciação da tradução (ATG).

Recentemente, Catanese et al. (2016) desenvolveram o software *RepeatAnalyzer*, que analisa e identifica sequências curtas repetidas, as *tandem repeats*, as quais o programa chama de SSRs. Este programa possui uma base de dados sobre todas as repetições e genótipos de *A. marginale*, assim como os locais onde foram encontradas e os trabalhos às quais pertencem. Sendo assim, o software pode indicar onde as SSRs já foram relatadas ou se é a primeira vez que tal repetição é identificada pelo programa. Além disto, outras análises também são fornecidas, como a análise de diversidade genética de determinada região, número de aminoácidos contidos nas sequências depositadas, índices de repetições únicas, assim como a sua distribuição na região específica e mapas geográficos com a distribuição dos genótipos (CATANESE et al., 2016).

Diferentes estirpes de *A. marginale* já foram associadas á casos de surtos de anaplasrose no Brasil, sendo frequentemente encontradas em rebanhos, como no estado de São Paulo e Goiás (MACHADO et al., 2015). Mundialmente, estirpes como a α - β^3 - Γ e a τ -10-15, por exemplo, já foram descritas em surtos ocorridos no México (ALMAZÁN et al., 2008) e Argentina (RUYBAL et al., 2009). Palmer et al.,

(2001) descreveram uma infecção persistente de *A. marginale* em rebanhos de bovinos amostrados nos Estados Unidos. Não demonstrando sinais clínicos de anaplasmose, estes animais desempenhavam o papel de reservatórios da bactéria, disseminando-a para carrapatos da área e contribuindo para a circulação das estirpes na região.

Muitas cepas de *A. marginale* já foram identificadas ao redor do mundo, que se diferem em sua morfologia, características antigênicas e sua capacidade de ser transmitida por carrapatos (SMITH et al., 1986; DE LA FUENTE et al., 2001a; KOCAN et al., 2004; CABEZAS-CRUZ et al., 2013) sendo de extrema importância conhecer cada uma delas para estudos de epidemiologia e de estratégias de controle (CABEZAS-CRUZ E DE LA FUENTE, 2015; JAIMES-DUEÑEZ et al., 2018). Na Colômbia, Jaimes-Dueñez et al. (2018) estudaram a diversidade genética do *A. marginale* em fazendas localizadas nas regiões de Antioquia e Arauca, sendo o foco do estudo bovinos, búfalos e carrapatos que parasitavam estes animais. Os resultados mostraram que dos 1432 bovinos analisados, 785 (54.8%) mostraram significativamente positivos para *A. marginale* baseados na PCR para o gene *msp5*. As análises moleculares do mesmo gene mostraram que 13.1% (20/152) búfalos foram positivos. Para a avaliação de diversidade genética foram isolados 15 amostras de bovinos e 3 de búfalos, onde foram encontrados 3 diferentes genótipos baseado no gene *msp1 α* , C, E e K, na região de microssatélite 5'UTR. O genótipo E foi o mais frequente (72%) e foi encontrado em ambos os hospedeiros, enquanto os genótipos C e K foram detectados apenas nos bovinos. Todos os isolados diferiram um do outro no padrão de repetição em tandem de *msp1 α* . O número de repetições variou de dois a quatro.

Aktas e Özübek (2017) também relataram diversidade genética da bactéria em vacas leiteiras localizadas em uma fazenda no Peru. Baseada nas sequências de microssatélite do *msp1 α* amplificadas pela PCR detectou-se distâncias SD-ATG entre 19 e 23 nucleotídeos e três genótipos, E, C e G. Sendo assim foi confirmada a presença de genótipos diferentes circulantes na região.

No estudo de Silva et al. (2015) no Rio de Janeiro, a avaliação de diversidade genética de *A. marginale*, sob condições de infecção natural, baseada nas *tandem repeats* da proteína MSP1 α , revelou 19 estirpes diferentes. Este grande número

talvez possa ser consequência de uma exposição natural do rebanho á carrapatos que transmitem a bactéria (*Rhipicephalus microplus*), pois os animais do presente estudo não foram isolados e tratados para qualquer infestação por artrópodes, sendo assim, animais de fora da amostragem podem ter introduzido novas estirpes ao rebanho.

O estudo de Souza-Ramos et al. (2019) identificou, pelos ensaios de PCR baseados no gene *msp1 α* , quatorze estirpes circulantes em bezerros e vacas localizadas em diferentes fazendas no Pantanal-Sulmatogrossense. Dentre estas quatorze, oito estirpes eram novas, não sendo relatadas na literatura anteriormente, são elas T-10-13-13-18; T- 27-18; EV8-EV8-17; α - β - β -100; EV7-11-10-15; T-11-11-27-18; T-11-10-15; T-27-13-18, mostrando uma alta diversidade de estirpes na região estudada.

2.8 Susceptibilidade à *A. marginale*

Em seus primeiros meses de vida bezerros encontram-se protegidos por anticorpos transferidos pela mãe, através do leite (POTGIETER e STOLTZ, 1994). Porém, este grupo de animais não está totalmente imune a anaplasiose bovina e trabalhos, como o de Silva et al. (2015), já relataram a bactéria circulando entre eles. Isto se deve a alguns fatores como: possível falha na transferência de anticorpos oriundos da mãe, o declínio natural dos anticorpos ao longo dos primeiros meses de vida, altas infestações por carrapatos e moscas (RIBEIRO et al., 2003) e, ainda, transmissão transplacentária, relatada em diversos trabalhos (ZAUGG, 1985; GRAU et al., 2013; COSTA et al., 2016; SILVA et al., 2015; 2016; AKTAS E ÖZÜBERK, 2017) A exposição dos bezerros a uma baixa carga parasitária durante seus primeiros dias de vida é importante para que o animal desenvolva uma imunidade ativa contra o parasita, sem a dependência da imunidade passiva dada pelo colostro (SOUZA-RAMOS et al., 2019).

A enfermidade se torna crônica uma vez que os animais consigam passar pela fase aguda da doença. Medicamentos, como as tetraciclinas e fluoroquinolonas, que atuam sobre a *A. marginale* conseguem agir somente sobre a fase aguda. Esta infecção é essencial para que o parasita continue circulando entre o rebanho, sendo o carrapato vetor o responsável por transmiti-lo através do repasto sanguíneo entre

o animal infectado e o sadio. Eriks et al. (1993) demonstrou que a alimentação dos carrapatos entre animais cronicamente infectados e sadios parece ser eficiente, observando que 50% dos carrapatos se tornam infectados após se alimentarem. Em relação aos tratamentos existentes, a Organização Mundial da Saúde Animal propôs que a enrofloxacin, o imidocarb e a oxitetraciclina fossem utilizados para o tratamento de infecções persistentes de *A. marginale* em bovinos. (SILVA et al., 2016). No entanto, estudos demonstraram que esses antimicrobianos são eficazes apenas na forma aguda da enfermidade, tornando a infecção persistente (COETZEE et al., 2005).

A infecção crônica também depende da invasão da bactéria em novas hemácias, continuamente. Levando em conta o tempo de vida de um eritrócito, por volta de 160 dias, o *A. marginale* precisa reinfetar novas hemácias e fazer replicações contínuas para que o animal permaneça com bactéria (PALMER et al., 2001). Devido à capacidade de variação antigênica de suas proteínas de superfície o parasita consegue escapar do sistema imune do hospedeiro e assim permanecer replicando-se exponencialmente dentro dos eritrócitos (PALMER et al., 1999).

2.9 Tratamentos e vacinas para Anaplasmosse

Por mais de 100 anos, *A. marginale* subsp. *A. centrale* compôs a vacina viva para anaplasmosse bovina (THEILER, 1910). Hoje, este tipo de vacina ainda é usado por países da África, América do Sul, Oriente Médio e na Austrália (BELL-SAKYI et al., 2015). Entretanto, já foi demonstrado que esta vacina oferece baixa, ou até mesmo nenhuma proteção. Além disso, vacinas vivas podem trazer desvantagens, como risco de cotransmissão de outros patógenos de ruminantes transmitidos pelo sangue, como a leucemia bovina, patógenos desconhecidos ou ainda patógenos emergentes, e risco potencial da doença transmitida pela própria cepa presente na vacina. Por estes motivos alguns países proíbem este tipo de prevenção, como os Estados Unidos e a União Europeia (BRAYTON et al., 2006; BELL-SAKYI et al., 2015; QUIROZ-CASTAÑEDA et al., 2016).

As vacinas chamadas de mortas também são utilizadas. Elas são baseadas no uso da bactéria extraída de eritrócitos bovinos, porém apresentam desvantagens, como a possível contaminação com antígenos presentes na membrana dos

eritrócitos e a ampla variação antigênica em diferentes regiões geográficas (OCAMPO ESPINOZA et al., 2006). Os dois tipos de vacinas, as vivas e mortas, apesar de induzirem uma resposta imune do hospedeiro e diminuir os sinais clínicos da doença, não agem de maneira eficaz sob a infecção, de modo que ela se torna persistente (KOCAN et al., 2010). Uma vez que os animais apresentem quadros de anaplasmoses crônicas, novos bovinos podem ser infectados e, desta maneira, a doença não é erradicada dos rebanhos.

O desafio para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a anaplasmoses é a grande diversidade de estirpes, geneticamente distintas uma das outras. Estudos filogenéticos feitos nos Estados Unidos mostraram que há mais genótipos de *A. marginale* do que se era conhecido anteriormente (DE LA FUENTE et al., 2001b, 2002, 2007, 2010; MTSALI et al., 2007). Para que esta suposta vacina apresente uma eficácia seria necessário a habilidade de proteger o animal de mais de um genótipo. Sendo assim, a vacina ideal contra a anaplasmoses seria a que induz uma imunidade protetora e previne a infecção de bovinos e de carrapatos, além de impedir a capacidade vetorial dos carrapatos (KOCAN et al., 2010).

Já foi relatada proteção contra o *A. marginale* utilizando-se vacinas contendo MSP1 e MSP2, proteínas imunodominantes que fazem parte da superfície da bactéria. Porém, quando combinadas, as proteínas não oferecem esta proteção (PALMER E MCELWAIN, 1995; QUEIROZ-CASTAÑEDA et al., 2016). De la fuente et al. (2005) já trabalhava com possíveis vacinas contendo epítomos variados das proteínas de superfície de *A. marginale*. Em seu trabalho observou-se que vacinas contendo diversos epítomos revelavam uma proteção parcial para os animais, porém, quando os epítomos em questão eram os provenientes das proteínas MSP1 α ou MSP2, a vacina mostrava ser mais eficaz, revelando melhores resultados.

É conhecido que as proteínas de superfície de *A. marginale* podem proteger o gado contra a doença clínica e até a infecção em alguns indivíduos (BROWN et al., 1998; NOH et al., 2008). Por isto busca-se a identificação de antígenos e epítomos para o desenvolvimento de uma vacina que contenha subunidades com papéis importantes na ativação da resposta imune (NOH e BROWN, 2012). Experimentos já foram feitos buscando entender quais proteínas de superfície desempenham os papéis mais importantes na infecção e concluiu-se que um

complexo de proteínas se mostrou eficaz na imunização do gado. Este complexo foi composto por 11 proteínas de superfície do *A. marginale*, sendo elas: OMP1, OMP7-9, MSP1 α , MSP2, MSP3, MSP4, OpAG2, Am779 e o peptidoglicano associado à Am854 (NOH et al., 2008; SUAREZ E NOH, 2011).

Ainda faltam informações para que uma vacina ampla possa ser desenvolvida e que atinja estirpes de regiões geográficas distintas, porém existem fortes evidências sugerindo que um subconjunto dos candidatos à vacina podem ser conservados e, portanto, é possível o desenvolvimento de uma vacina com ampla proteção (JUNIOR et al., 2010). As proteínas OMP7 a 9 mostram alta porcentagem de identidade quando comparadas. A OMP7 das estirpes brasileiras tem de 65-72% de identidade com a estirpe de St. Maries na Flórida (JUNOR et al., 2010). Entre as cepas americanas esta porcentagem é mais alta, entre 86 a 99% (AGNES et al., 2011). Cangussu et al., (2018) desenvolveram uma proteína híbrida contendo repetições da proteína de superfície MSP1 α e das proteínas de membranas OMP7/8/9 para criação de uma vacina que fosse eficaz no controle da anaplasnose e no desenvolvimento da resposta imune dos animais. Os camundongos utilizados no experimento, que receberam a vacina teste, mostraram-se imunizados desenvolvendo resultados satisfatórios como queda na riquettsemia, nenhum sinal clínico e alta imunogenicidade nos resultados de ELISA indireto.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho objetivou avaliar, por meio de um estudo longitudinal, a diversidade genética do *A. marginale* em bovinos naturalmente infectados e em situação de surto da doença, pertencentes a um rebanho de corte da raça Angus na cidade de Itú, no estado de São Paulo.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a detecção molecular, por PCR em tempo real e PCR convencional, do *A. marginale* em bovinos de corte durante surto da doença, utilizando 20 animais com 1 a 3 repiques da riquettsemia;
- Identificar a diversidade genética do *A. marginale* nos animais estudados por meio da análise das *tandem repeats* do gene *msp1 α* e determinar a carga parasitária por qPCR para o gene *msp1 β* ;
- Realizar ensaios de clonagem para detectar possíveis coinfeções nos bovinos amostrados;
- Comparar filogeneticamente as amostras de *A. marginale* identificadas nos animais da propriedade com as demais sequências disponíveis no GenBank.
- Realizar a detecção indireta do *A. marginale* por meio do Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Colheitas das amostras

As colheitas foram realizadas em um rebanho bovino de corte da raça Angus, com idades variando entre 6 meses a 9 meses, de uma propriedade localizada na cidade de Itú (Latitude: 23° 15' 57" Sul, Longitude: 47° 17' 57" Oeste), no estado de São Paulo (**Figura 2**) que possuía histórico de anaplasrose bovina e estavam em situação de surto da doença. Foram colhidas amostras de sangue de 20 bovinos (*Bos taurus taurus*) da veia jugular, optando-se por animais que durante quadros de anaplasrose clínica receberam um, dois ou até três tratamentos, considerando os repiques (reagudização) com sinais clínicos evidentes. Estes animais eram de origem da fazenda (nascidos no local), com sistema de criação extensiva e encontravam-se infestados por carrapatos, porém não foi identificada a presença de moscas no rebanho. Os 20 bovinos selecionados foram acompanhados durante 4 meses, sendo realizadas 4 colheitas de sangue: a primeira em 5 de abril de 2017, a segunda em 24 de maio de 2017, a terceira em 12 de junho de 2017, e a última em 4 de julho de 2017, totalizando 80 amostras de sangue e soro. Os tratamentos foram realizados com oxitetraciclina (1 mL/kg) em três aplicações a cada 24 horas. Além disso, os animais também receberam doses de Cloridrato de Imidocarb (1 mL/40kg) e diaceturato de diminazeno (1 mL/20 kg). Duas amostras de sangue foram colhidas de cada animal em cada colheita. Uma primeira em tubos com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para estimativa da riquettsemia por quantificação por qPCR e obtenção de amplicons de *mosp1a* por meio de snPCR. A segunda amostra de sangue foi colhida utilizando tubos sem anticoagulante, visando à obtenção de soro para a detecção de anticorpos IgG anti-*A. marginale* pelo Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA).



Figura 2. Cidade de Itú, localizada no estado de São Paulo, sudeste brasileiro, com as seguintes coordenadas: Latitude: 23° 15' 57" Sul, Longitude: 47° 17' 57" Oeste (Google Imagens).

4.2 Volume globular

O volume globular dos animais amostrados foi determinado pela técnica de micro-hematócrito. Foram considerados bovinos não-anêmicos aqueles animais com volume globular entre 24% e 46%, e anêmicos aqueles que apresentarem volume globular inferior a 24% (WEISS; WARDROP, 2010).

4.3 Extração de DNA

DNA das amostras de sangue de bovinos foi extraído utilizando o ThermoFisher Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit, conforme recomendações do fabricante. A concentração do DNA obtido de cada amostra, assim como suas relações de pureza, foram mensurados utilizando aparelho espectrofotômetro (NanoDrop - ThermoScientific). As amostras de DNA foram então armazenadas a -20 °C, para posterior realização da PCR.

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

Para verificar a presença de inibidores nas amostras de DNA, foi realizada uma reação de PCR convencional para o gene endógeno *gapdh*, seguindo o protocolo estabelecido por Birkenheuer et al. (2003). Para tal, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores GAPDH-F (5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3') e GAPDH-R (5'- CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3'). A amplificação foi realizada utilizando uma reação de volume total final de 25 µL, com uma mistura contendo 5 µL do DNA-amostra, 0,2 µM de cada deoxinucleotídeo, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3,0 mM de Cloreto de Magnésio, 1,25 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen ®, Carlsbad, California, Estados Unidos), tampão da PCR e água ultra-pura esterilizada q.s.p. A sequência térmica e 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 (BIRKENHEUER et al., 2003).

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

As amostras positivas na PCR convencional anteriormente descrita baseada no gene *gapdh* foram submetidas à reação de qPCR para *A. marginale* baseada no gene *msp1β* seguindo protocolo previamente descrito por Carelli et al. (2007). A reação teve volume final de 10 µL, contendo 1 µL de DNA genômico, 5 µL de Taq DNA polimerase (BioRad® CA, Estados Unidos) 0,9 µM de cada iniciador (AM F:- 5'-TTGGCAAGGCAGCAGCTT-'3 e AM- R: 5'-TTCCGCGAGCATGTTGCAT-3') e 0,2 µM da sonda de hidrólise (AM-sonda: 6FAM-5'-TCGGTCTAACATCTCCAGGCTTTCAT-3'-BHQ1). 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, Estados Unidos). Todas as amostras foram testadas em triplicatas. A quantificação do número de cópias de DNA-alvo/µL foi realizada com a utilização do plasmídeo pSMART

(Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA) contendo a sequência alvo para amplificação do DNA de *A. marginale*.

Diluições seriadas foram feitas a fim de construir padrões com diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo a sequência-alvo ($2,0 \times 10^7$ cópias/ μL a $2,0 \times 10^0$ cópias/ μL). O número de cópias de plasmídeos foi determinado de acordo com a fórmula $(\text{Xg}/ \mu\text{L DNA}/ [\text{tamanho do plasmídeo (pb)} \times 660]) \times 6.022 \times 10^{23} \times$ cópias do plasmídeo/ μL). Água estéril ultra pura (Qiagen[®], Madison, Estados Unidos) e DNA obtido a partir de amostras de sangue de bovinos negativos (SILVA et al., 2015) para *A. marginale* foram utilizados como controle-negativos da reação. Alíquota de DNA da amostra Jaboticabal de *A. marginale* foi utilizada como controle positivo da reação.

4.6 snPCR para *A. marginale* baseada no gene *msp1 α*

As amostras positivas na qPCR para *A. marginale* baseada no gene *msp1 β* foram submetidas à snPCR para o referido parasita, baseada no gene *msp1 α* , utilizando protocolo previamente descrito por Castañeda-Ortiz et al., (2015). A reação foi conduzida com um volume final de 25 μL , contendo 2,5 μL de DNA genômico, 12,5 μL taq PCR MasterMix QIAGEN[®], 0,5 μL de cada oligonucleotídeo iniciador e água ultra-pura esterilizada (QIAGEN[®]) q.s.p. A segunda reação foi realizada com volume final de 25 μL , contendo 1 μL de DNA amplificado na primeira reação e as mesmas concentrações dos demais reagentes anteriormente descritas. As reações foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores F1 (5'-GTGCTTATGGCAGACATTTCC-3'), R1 (5'-CTCAACACTCGCAACCTTGG-3') e *msp1 α* NF (5'-CGCATTACACGTTCCGTATG-3') (CASTAÑEDA-ORTIZ et al., 2015). As reações de amplificação foram realizadas de acordo com sequência térmica: desnaturação inicial de 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 30 segundos e 72 °C por 35 segundos, seguidos de uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Na segunda reação de PCR objetivando a amplificação do fragmento mais interno do *msp1 α* foram utilizadas as seguintes condições de termociclador: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 35

segundos, 65 °C por 58 segundos e 72 °C por 30 segundos, e extensão final de 72 °C por 10 minutos.

4.7 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. O processo foi realizado a 100 V/350 mA durante 50 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (Thermo Scientific, Sam Jose, CA, Estados Unidos). Os resultados foram visualizados e analisados através de um transiluminador de luz ultravioleta acoplado a um programa computacional de análise de imagens (Chem-Doc, Bio-Rad®).

4.8 Reações de Clonagem

4.8.1 Reação de ligação do produto amplificado com o vetor pGEM-T Easy

As amostras que apresentaram padrões de bandas múltiplas na eletroforese em gel de agarose foram submetidas à clonagem no vetor pGEM-T Easy (Promega®), seguindo as recomendações do fabricante. A reação de ligação de DNA de interesse com o vetor, de volume final 10 µL, consistiu em adicionar 3 µL do inserto (DNA da amostra), 5 µL de tampão da enzima, 1 µL do vetor pGEM-T Easy, 1 µL da enzima T4 Ligase (Promega®) e água esterilizada ultra-pura q.s.p. As soluções foram misturadas e incubadas a 4 °C por 18 horas para a obtenção do número máximo de transformantes.

4.8.2 Transformação das células competentes de *Escherichia coli* One Shot Match 1™ T1^R

O produto da ligação descrita anteriormente foi utilizado para transformar células competentes *E. coli* One Shot Match 1™ T1^R Chemically Competent Cells (Invitrogen Cat # C8620-03) ($10^9 - 10^{10}$ cfu/ng de DNA). Foram adicionados os 10 µL

da reação de ligação a 50 µL de células competentes e a mistura foi mantida por 30 minutos no gelo. O choque térmico das células foi realizado colocando os microtubos em banho-maria a 42 °C por 2 minutos. Foram adicionados 250 µL de meio líquido Lúria Bertani a cada microtubo e as células foram incubadas a 37°C durante uma hora e meia, sob agitação. Foram adicionados 250 µL de células transformadas a cada placa contendo meio sólido Lúria Bertani, preparadas com 100 µg/mL de ampicilina, 40 µL de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) (0,026%) e 20 µL IPTG (isopropylthio-β-galactoside)(0,82mM). As colônias de bactérias contendo os clones (colônias brancas) foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL contendo 5 mL de meio líquido LB e 100 µg/mL de ampicilina. Após incubação a 37 °C por até 24 horas foi feita a extração do DNA plasmidial e em seguida a sua PCR.

4.8.3 Minipreparação do DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o kit illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Reino Unido) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram armazenadas a -20 °C para serem utilizadas posteriormente em reações de PCR para a confirmação da técnica de clonagem.

4.8.4 PCR convencional para confirmação da presença do inserto-alvo

O DNA plasmidial extraído dos clones foi submetido a um ensaio de PCR convencional, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores M13 F (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3') e M13 R (5'-GTCATAGCTGTTTCCTGTGTGA-3') (LAU et al., 2010), que flanqueiam o local de clonagem do plasmídeo pGEM T-easy e, portanto, inclui as inserções do gene *msp1α*.

4.9 Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados

Os produtos de PCR baseados no gene *msp1 α* obtidos pela snPCR e pela técnica de clonagem foram purificados utilizando-se o kit “ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent” (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado por meio de técnica automatizada baseada no método de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (SANGER et al., 1977) no sequenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). O sequenciamento dos amplicons foi conduzido no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) localizado no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP Jaboticabal.

4.10. Análise das sequências

4.10.1 Análise das sequências Consenso baseadas no gene *msp1 α*

As sequências de nucleotídeos provenientes do sequenciamento foram inseridas no programa Phred Phrap (EWING, 1998) para triagem e avaliação da qualidade dos eletroferogramas. Bases com qualidade acima de 20 foram consideradas confiáveis. Também no mesmo programa foram geradas as sequências Consenso. O programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) foi usado para comparar as identidades dos nucleotídeos obtidos com sequências depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (BENSON et al., 2002).

4.10.2 Classificação de genótipos de *A. marginale* e identificação da diversidade genética

Para analisar a diversidade genética do gene *msp1 α* foram utilizadas as sequências de nucleotídeos do presente estudo e sequências previamente depositadas no GenBank. Para identificar o genótipo foi feita a classificação proposta por Estrada-Peña et al. (2009) seguindo os seguintes passos: encontrou-se a região chamada de Shine-Dalgarno (GTAGG) e logo em seguida o próximo códon

de iniciação da tradução (ATG). Dentro deste intervalo (GTAGG-ATG) foram contabilizados os GTT, chamando-os de “m” e os GT, chamando-os de “n”. A análise de sequências repetidas foi realizada conforme a nomenclatura proposta por De la Fuente et al. (2007). A distância SD-ATG foi calculada segundo a fórmula $(4 \times m) + (2 \times n) + 1$ descrita por Estrada-Peña et al. (2009). Por esta fórmula foi possível obter o número de nucleotídeos e posteriormente classificar as amostras em genótipos, segundo critérios descritos por de la Fuente et al. (2002).

As sequências Consenso obtidas foram transformadas em aminoácidos com o auxílio da ferramenta de tradução ExPaSy [<http://web.expasy.org/translate/>] do Instituto Suíço de Bioinformática e a sua variabilidade de aminoácidos foi analisada através do Software RepeatAnalyzer (CATANESE et al., 2016). A diversidade genética foi calculada usando índices métricos que medem a porcentagem das repetições únicas em uma região (GDM1) e também a regularidade com que estas repetições são distribuídas (GDM2). O software também calculou a frequência de cada repetição (SSRs) na região estudada e mostra quais estirpes são únicas para o estudo, comparado com estudos depositados no banco de dados.

O GDM1 e o GDM2 são apresentados em duas variantes, local e global, dependendo se o cálculo métrico é uma média dos valores de cada genótipo ou de sua região, respectivamente (CATANESE et al., 2016).

4.10.3 Análises filogenéticas

As sequências de nucleotídeos salvas em modo “FASTA” foram alinhadas com outras sequências homólogas do mesmo gene sequenciado, retiradas do banco de dados (Genbank), utilizando o software MAFFT. Os alinhamentos salvos em modo “FASTA” foram transformados em modo Nexus, Phylip e Mega pelo site Alignment Transformation Environment (GLEZ-PEÑA et al., 2010). Foi realizada análise de Máxima Verossimilhança utilizando a plataforma online IQtree (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>). O modelo evolutivo foi encontrado utilizando o software jModelTest 2 (GUINDON e GASCUEL, 2003; DARRIBA et al., 2012). Os suportes dos cladogramas para as análises de Máxima Verossimilhança foram avaliados através de análises de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) de 1000 repetições. A

edição da árvore filogenética assim como o enraizamento (via grupo externo) foi realizada utilizando o software Treegraph 2.0.56-381 beta (STOVER e MULLER, 2010).

4.11 Ensaio Imunoenzimático Indireto (iELISA)

Para a detecção de anticorpos da classe IgG anti- *A. marginale* foi utilizado o ELISA indireto (iELISA). Foram feitos dois testes de iELISA, o primeiro sendo utilizado antígeno total produzido no Laboratório de Imunoparasitologia da FCAV/UNESP Jaboticabal para a sensibilização das placas, segundo protocolo estabelecido por Machado et al. (1997) para *B. bovis* e adaptado para *A. marginale* por Andrade et al. (2004). O segundo teste de iELISA foi realizado utilizando a proteína recombinante MSP5 de *A. marginale*, seguindo o protocolo de Machado et al. (1997). Os testes foram realizados utilizando-se concentração ótima do antígeno/proteína recombinante de *A. marginale* de 12µg/mL, diluído em tampão carbonato bicarbonato (0,05M, pH 9,6). A cada pocinho da placa foi adicionado 100 µl do antígeno, deixando dois pocinhos sem antígeno, para o controle da reação. As placas foram incubadas por 12 horas à 4 °C e, posteriormente, foi feito o bloqueio com tampão carbonato-bicarbonato, adicionado de 5% de leite em pó desnatado (Molico[®], Nestlé, Brasil). Realizou-se a diluição única de 1:200 para os soros de referência positiva, negativa e soros-testes. As placas foram então incubadas por 90 minutos à 37 °C, em câmara úmida. Após três lavagens com tampão PBS-Tween 20 (fosfato salina, pH 7,2 e Tween 20), foi adicionado à placa de ELISA o conjugado anti-IgG de bovino ligado à fosfatase alcalina na diluição de 1:25000, conforme recomendações do fabricante (Nº do catálogo A0705, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), com posterior incubação e lavagem. Por fim, adicionou-se o substrato da enzima fosfatase alcalina, o p-nitrofenil fosfato (Sigma, St. Louis, MO), diluído a 1mg/mL em tampão dietanolamina (pH 9,8) (Sigma, St. Louis, MO), sendo então as placas seladas com papel alumínio e incubadas por 45 minutos em temperatura ambiente. A leitura das placas foi feita em leitor de ELISA (B.T. -100; Embrabio, São Paulo, Brasil), com filtro de 405nm. Os resultados obtidos foram agrupados em níveis de ELISA (NE), que variam de 0 (nível mais baixo) a 9

(nível mais alto). Valores ($NE \geq 3$) foram considerados positivos. Os cálculos dos NE foram delineados conforme Machado et al. (1997), a partir dos valores de absorbância.

$$A/P = \frac{\text{Absorbância média da amostra} - \text{Absorbância média do controle negativo}}{\text{Absorbância média dos controles positivos} - \text{Absorbância média dos controles negativo}}$$

Onde A= Amostra de soro bovino teste e P= amostra de soro bovino sabidamente positiva

5. RESULTADOS

5.1. Volume globular

Sessenta por cento (48/80) das amostras apresentaram volume globular entre 24% e 46%, sendo considerados não-anêmicos pela técnica de micro-hematócrito. Por outro lado, 40% (32/80) das amostras sanguíneas apresentaram VG inferior a 24%, com porcentagens que variaram de 14% a 22%. Estes animais, apesar de serem considerados anêmicos, não apresentavam sintomatologia evidente e mostravam estar aparentemente sadios.

5.2. Análises moleculares

5.2.1 Ensaios de qPCR para *A. marginale* baseados no gene *msp1β*

Todas as 80 amostras de DNA foram positivas no ensaio de cPCR para o gene endógeno (*gapdh*). Nos ensaios de qPCR baseados no gene *msp1β* verificou-se 100% de positividade, com a média de Cq de 20,57; 24,5; 19,5 e 22,98 para as colheitas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. A quantificação ficou entre 10^3 e 10^7 de cópias de um fragmento de *msp1β*/μL de DNA. Os parâmetros dos ensaios de qPCR

foram de 103,7% de eficiência, 0,985 de coeficiente de determinação, 3,236 para a inclinação e 44,327 no intercepto do eixo y.

5.2.2 Ensaio de cPCR para *A. marginale* baseados no gene *msp1 α* e análise de identidade das sequências obtidas pelo BLASTn

Dentre as 80 amostras positivas nos ensaios de qPCR, um total de 57,5% (46/80) mostraram positividade para o fragmento de gene *msp1 α* , sendo elas 13/20 na colheita 1; 14/20 na colheita 2; 9/20 na colheita 3 e 10/20 na colheita 4. Dentre as amostras positivas sequenciadas foi possível obter 36 sequências com qualidade referente ao gene *msp1 α* , por meio de análise de qualidade feita pelo programa Phred Phrap. As sequências obtidas, quando submetidas ao BLASTn, revelaram porcentagens de identidade variando de 95% a 100% com sequências de *A. marginale* previamente depositadas no GenBank e cobertura entre 96% a 100%. Doze amostras foram clonadas, objetivando 3 clones de cada amostra e suas sequências também foram analisadas da mesma forma citada anteriormente.

5.2.3 Análise de diversidade genética de *A. marginale* baseada no gene *msp1 α*

Utilizando o software *RepeatAnalyzer* para a classificação genotípica alfanumérica e identificação de estirpes, foram encontradas 36 estirpes nas amostras que não foram submetidas à clonagem, das quais seis já relatadas na literatura (τ 27 18; α β β Γ ; γ ; **LJ1 13 18; α β β β ; E Z; ϕ ;Z; ϕ Z; ϕ ;Z; ϕ F F; E Z; ϕ ;Z; ϕ Z; ϕ ;Z; ϕ F) e as outras trinta nunca antes descritas (Tabela 1).**

Tabela 1. Caracterização dos genótipos e estirpes das amostras positivas para o gene *msp1α* de *A. marginale*, com número do animal, identificação da colheita, estimativa da riquetsemia por qPCR absoluta e distribuição geográfica, de acordo com o banco de dados do *RepeatAnalyzer*.

Animal	Colheita	Riquetsemia absoluta qPCR (<i>msp1β</i> /μL)	Genótipo (Estada-Peña et al., 2009)	Genótipo/estirpe (Catanese et al., 2016)	Distribuição das estirpes (Brasil/Mundo)
2259	1	3.54x10 ⁶	E	13 27 13 27 13 F	Itú, São Paulo, Brazil
2287	1	6.07x10 ⁵	H	τ 27 18	São Paulo, Brazil, Mato Grosso do Sul, Brazil
2308	1	7.23x10 ⁵	H	α β β Γ;γ;Γ;γ;Γ;γ;Γ;γ	Rio de Janeiro, Brazil; São Paulo, Brazil; Minas Gerais, Brazil; Goiás, Brazil; Morelo, Mexico; Nayarit, Mexico
2250	1	3.51x10 ⁵	E	13 13 27 13 F	Itú, São Paulo, Brazil
2239	1	2.40x10 ⁵	E	13 27 13 27 13 F	Itú, São Paulo, Brazil
2240	1	4.00x10 ⁴	E	13 27 13 27 13	Itú, São Paulo, Brazil
2272	1	4.56x10 ⁶	H	16 F F	Itú, São Paulo, Brazil
2318	1	4.45x10 ⁵	H	16 F 91	Itú, São Paulo, Brazil
2319	1	1.04x10 ⁵	H	16 F F	Itú, São Paulo, Brazil
2241	1	5.53x10 ⁵	H	τ 10	Itú, São Paulo, Brazil
2261	1	2.46x10 ⁵	H	τ 27 18	São Paulo, Brazil; Mato

					Grosso do Sul, Brazil
2295	1	1.12×10^5	C	16 F 17	Itú, São Paulo, Brazil
2243	2	3.13×10^3	H	LJ1 13 18	São Paulo, Brazil; Minas Gerais, Brazil
2249	2	7.16×10^4	F	E Z; ϕ ;Z; ϕ Z; ϕ ;Z; ϕ F F	Itú, São Paulo, Brazil
2259	2	2.0×10^5	F	E Z; ϕ ;Z; ϕ Z; ϕ ;Z; ϕ F F	São Paulo, Brazil; México
2290	2	1.44×10^2	H	16 F F	Itú, São Paulo, Brazil
2272	2	2.97×10^5	H	16 F	Itú, São Paulo, Brazil
2278	2	6.37×10^4	H	16 F	Itú, São Paulo, Brazil
2287	2	1.79×10^4	H	τ 27	Itú, São Paulo, Brazil
2319	2	3.32×10^3	F	E Z; ϕ ;Z; ϕ Z; ϕ ;Z; ϕ F	São Paulo, Brazil; México
2246	3	1.40×10^5	F	E Z; ϕ ;Z; ϕ Z; ϕ ;Z; ϕ F	São Paulo, Brazil; México
2249	3	4.31×10^5	F	E Z; ϕ ;Z; ϕ Z; ϕ ;Z; ϕ F	São Paulo, Brazil; México
2261	3	1.89×10^4	H	α β β β	São Paulo, Brazil; Maranhão, Brazil; Argentina
2263	3	3.41×10^4	E	13 27 13 27 13	**
2287	3	1.28×10^5	F	E F	**
2290	3	1.05×10^6	H	α β β β	São Paulo, Brazil; Maranhão, Brazil; Argentina

2291	3	5.10×10^5	H	$\alpha \beta \beta \beta Z; \phi; Z; \phi$	**
2295	3	6.81×10^4	H	$\tau 27 18$	São Paulo, Brazil; Mato Grosso do Sul, Brazil
2319	3	4.38×10^5	H	16 F	Itú, São Paulo, Brazil
2239	4	3.86×10^4	E	LJ1 13 LJ1 13	Itú, São Paulo, Brazil
2241	4	1.20×10^5	E	13 27 13 27 13	Itú, São Paulo, Brazil
2261	4	1.72×10^5	H	$\tau 10$	Itú, São Paulo, Brazil
2263	4	1.11×10^7	G	16 F F	Itú, São Paulo, Brazil
2291	4	4.27×10^5	F	28 M M M	Itú, São Paulo, Brazil
2295	4	1.22×10^3	F	63 29 104 29	Itú, São Paulo, Brazil
2318	4	1.59×10^5	H	$\tau 27$	Itú, São Paulo, Brazil

** Local não informado pelo programa *RepeatAnalyzer*.

Em vermelho: estirpes nunca antes relatadas pelo programa *RepeatAnalyzer*.

Pela classificação proposta por Estrada-Peña et al. (2009), o genótipo **H** se mostrou o mais comum na região estudada (19/36), porém outros genótipos foram relatados, como o **F** (8/36) e o **E** (7/36). Os genótipos **C** e **G** foram relatados apenas uma vez. Os animais **2241**, **2259**, **2263**, **2287**, **2291**, **2295** e **2319** apresentaram genótipos diferentes ao longo das colheitas (**Tabela 2**).

Tabela 2. Identificação dos genótipos segundo Estrada-Peña et al. (2009) nos bovinos de corte situados em uma fazenda no município de Itú, estado de São Paulo.

Amostra	Colheita 1	Colheita 2	Colheita 3	Colheita 4
2239	E	-	-	E
2240	E	-	-	-
2241	H	-	-	E
2243	-	H	-	-
2246	-	-	F	-
2249	-	F	F	-
2250	E	-	-	-
2259	E	F	-	-
2261	H	-	H	H
2263	-	F	E	G
2272	H	H	-	-
2278	-	H	-	-
2287	H	H	F	-
2290	-	H	H	-
2291	-	-	H	F
2295	C	H	H	F
2308	H	-	-	-
2312	-	-	-	-
2318	H	H	-	H
2319	H	F	H	-

-: amostras sem valores: DNA não amplificável na técnica de cPCR para o gene *msp1α*

Analisando as sequências clonadas observou-se que uma mesma amostra apresentava mais de uma estirpe, o que caracteriza coinfeção, como exemplo o animal **2318** que teve estirpes **E Z; φ; Z; φ; Z; φ; Z; φ F F; α β β β** e **E Z; φ; Z; φ; Z; φ; Z; φ**. Os dados das estirpes encontradas nas amostras submetidas à clonagem encontram-se na **Tabela 3**.

Tabela 3. Caracterização das estirpes das 12 amostras clonadas para o gene *msp1a* de *A. marginale*, com identificação dos animais, colheita e estirpe de cada clone.

Amostra	Colheita	C1	C2	C3
2263	1	E F	E Z;φ;Z; φ;Z; φ; Z; φ Z;φ;Z; φ;Z; φ; Z; φ F F	E Z;φ;Z; φ;Z; φ; Z; φ F F
2290	1	n/a*	n/a	α β F F
2250	2	16 F F	16 F	16 F
2263	2	E Z;φ;Z; φ;Z; φ; Z; φ Z;φ;Z; φ;Z; φ; Z; φ F	E Z;φ;Z; φ;Z; φ; Z; φ Z;φ;Z; φ;Z; φ; Z; φ F F	28 29 M F
2295	2	τ 15	F F F F F α β β	n/a
2318	2	n/a	Γ;γ;Γ;γ;Γ;γ;Γ;γ; Γ; Γ;Γ; Γ;Γ;Γ;Γ	n/a
2278	3	n/a	n/a	n/a
2287	3	E F	E F	n/a
2318	3	E Z;φ;Z; φ;Z; φ; Z; φ F F	α β β β	E Z;φ;Z; φ;Z; φ; Z; φ
2259	4	n/a	E Z;φ;Z; φ;Z; φ; Z; φ Z;φ;Z; φ;Z; φ; Z; φ F F	M M M M
2272	4	27 18	E Z;φ;Z; φ;Z; φ; Z; φ Z;φ;Z; φ;Z; φ; Z; φ τ 3	n/a
2287	4	16 N 18	27 18	n/a

n/a: amostra não amplificou na cPCR de confirmação da clonagem

Os índices métricos de diversidade genética de *A. marginale*, GDM1-Local (0,755) e GDM1-Global (0,25), obtidos das sequências clonadas e não clonadas, nos bovinos amostrados revelaram alto valor, sendo os índices medidos de 0 a 1. Isto indica que as repetições (SSRs) foram bastante diversas entre si e na região estudada. Os índices GDM2-Local (0,06) e GDM2-Global (0,053) mostraram-se baixos, indicando que as SSRs se apresentam em quantidades iguais entre si, ou seja, ocorreram aproximadamente o mesmo número de vezes e que a distribuição entre estes animais foi uniforme. Estes valores de GDM2 baixos indicam que as SSRs são pouco dispersas. Os índices métricos de diversidade genética do presente estudo e de outras regiões brasileiras se encontram na **Tabela 4**.

Tabela 4. Índices métricos de diversidade genética do gene *msp1a* de *A. marginale* encontrados em gado de corte de uma fazenda situada na cidade de Itú, estado de São Paulo, comparativamente aos índices encontrados em outros estados brasileiros (São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Pará (búfalos), Goiás e Mato Grosso do Sul), assim como os valores para o Brasil e o mundo, segundo o Software *Repeat Analyzer*.

Métrica	São Paulo (Itú) (Garcia et al., 2020)	Pantanal brasileiro - MS (Souza Ramos et al., 2019)	São Paulo (Taiapu) (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., 2013)	Paraná (Vidotto et al., 2006)	Rio de Janeiro (Silva e Fonseca, 2014)	Goiás (Machado et al., 2015)	Brasil (Geral)	Mundo
GDM1 - Local	0,755	0,854	0,802	0,8	0,933	0,817	0,75	1	0,792	0,675	0,796	0,756
GDM1 - Global	0,25	0,339	0,3	0,75	0,909	0,375	0,75	1	0,56	0,333	0,159	0,162
GDM2 - Local	0,06	0,051	0,093	0,094	0,028	0,086	0,117	0	0,097	0,153	0,07	0,086
GDM2 - Global	0,053	0,037	0,132	0,093	0,027	0,037	0,117	0	0,05	0,157	0,032	0,007

Em relação à frequência das estirpes, as repetições **91**, **17**, **104**, **63**, **29**, **28**, **M** ocorreram apenas uma vez, a repetição **α** ocorreu cinco vezes e **E** ocorreu seis vezes. A repetição que mais apareceu dentre as sequências foi a **18**, com frequência de dez vezes (**Figura 3**). A relação entre a quantidade de repetições e o número de aminoácidos mostrou o tamanho das SSRs, uma repetição apresentou o tamanho de **23** aminoácidos e outra com o tamanho de **28** aminoácidos. Todas as demais se mostraram com **29** aminoácidos (**Figura 4**). A correlação entre o número de genótipos e o número de SSRs encontradas estão apresentados na **Figura 5**.

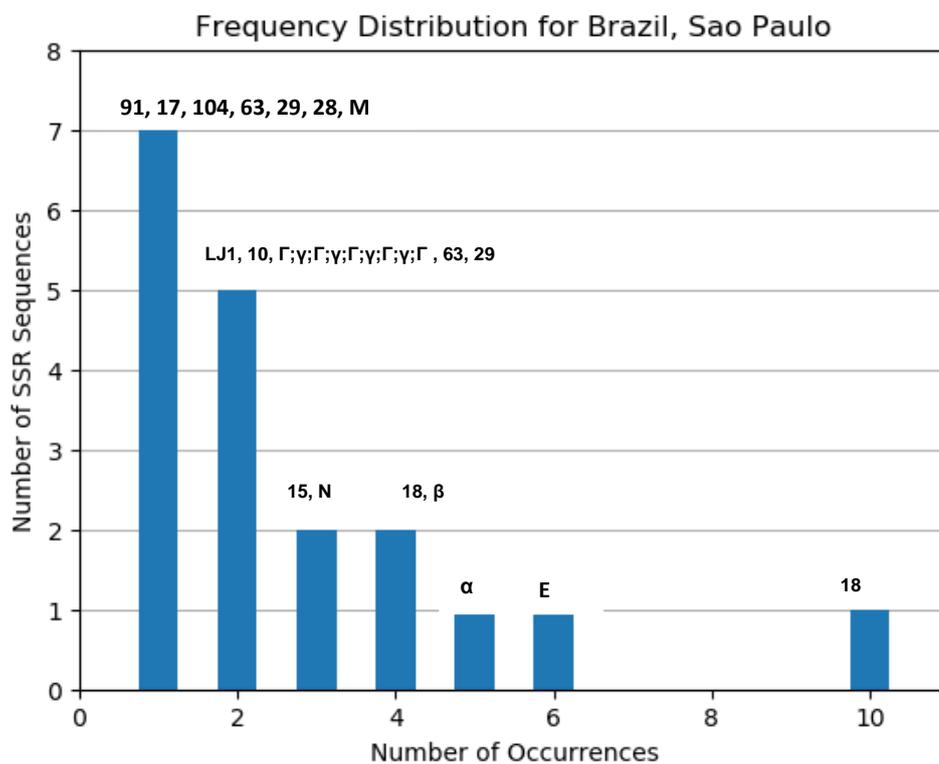


Figura 3. Número de ocorrência de cada repetição em *tandem* encontrada no gene *msp1 α* de estirpes de *A. marginale* em bovinos de corte numa fazenda situada em Itú, estado de São Paulo.

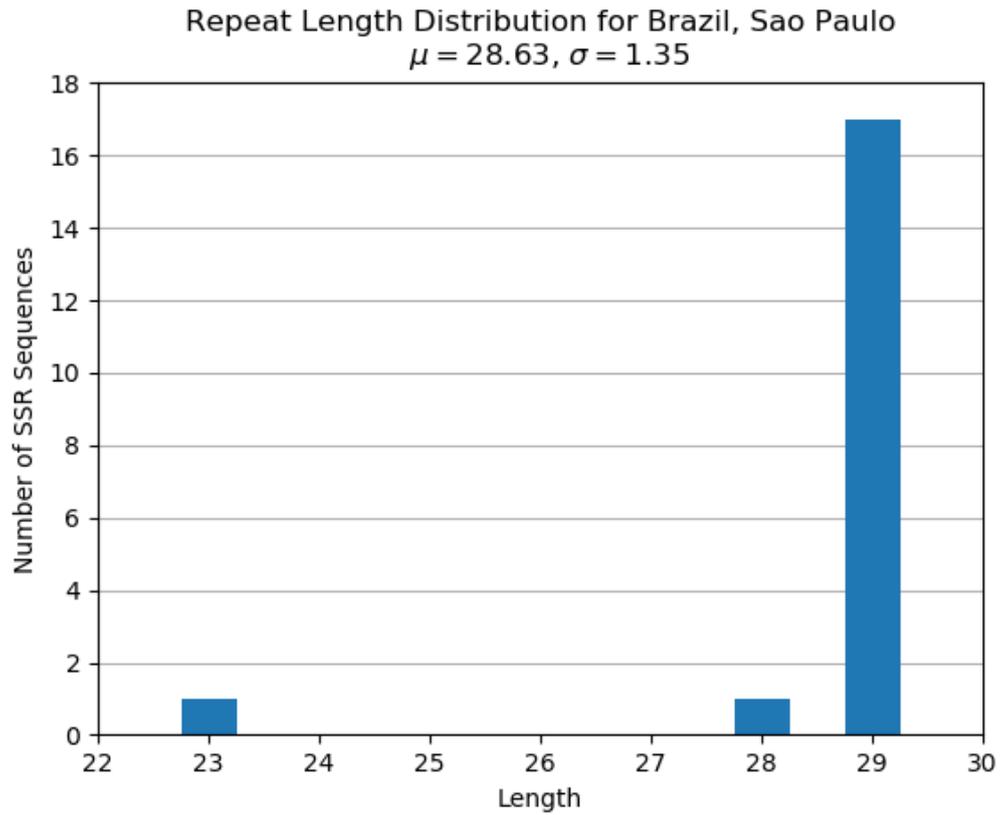


Figura 4. Número de repetições em *tandem* do gene *msp1 α* e seu tamanho (número de aminoácidos) encontrado em estirpes de *A. marginale* em bovinos de corte numa fazenda situada em Itú, estado de São Paulo. A maior parte das SSRs apresentaram tamanho de 29 aminoácidos.

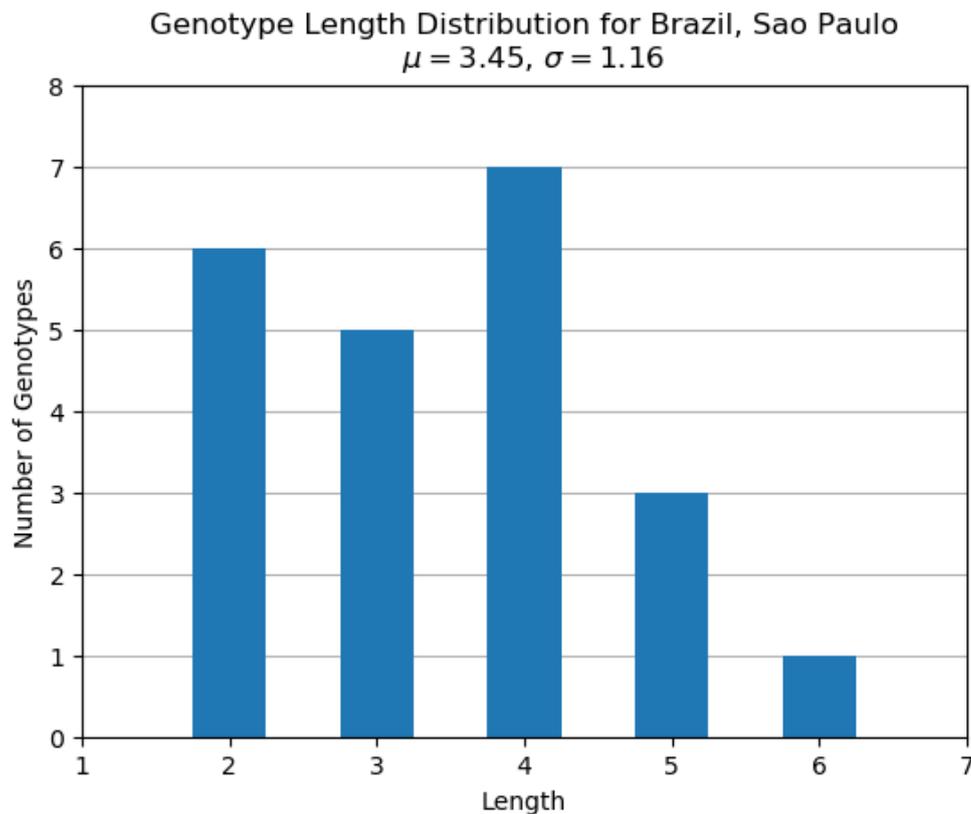


Figura 5. Correlação entre o número de genótipos e o número de repetições encontradas em estirpes de *A. marginale* em bovinos de corte numa fazenda situada em Itú, estado de São Paulo.

5.2.4 Inferência Filogenética

A inferência filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança (MV) e modelo evolutivo TN+F+G4 mostrou a formação de vinte e quatro clusters (grupos) contendo as sequências do gene *m_{sp}1 α* detectadas em bovinos de corte da cidade de Itú, São Paulo. A árvore foi construída com base nas sequências dos bovinos amostrados no local estudado e sequências de outros países (Rússia, Estados Unidos, África do Sul, Argentina, Itália, Porto Rico, México, Turquia, Colômbia) e estados brasileiros (Minas Gerais, Paraná, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro) previamente depositadas no GenBank (**Figura 6**).

As sequências utilizadas para a construção da árvore filogenética incluem amostras clonadas e também amostras não clonadas. É possível observar que as

sequências que apresentaram repetições iguais segundo o programa *RepeatAnalyzer* se posicionaram próximas em todos os clusters formados. A sequência correspondente ao bovino 2263 (coleta 2) se posicionou próximo a sequências encontradas nos Estados Unidos (**cluster 2**). Já no **cluster 4** encontram-se sequências clonadas e não clonadas que apresentaram repetições em comum, como a **F**; **29** e **28**, segundo o programa *RepeatAnalyzer*. Estas mostraram-se próximas a Porto Rico e México.

No **cluster 7** posicionaram-se sequências com o genótipo **$\alpha \beta \beta \beta$** , que apresentaram *bootstrap* de 54 em relação a uma sequência localizada no Pantanal Sul-matogrossense (MK030595). Seguindo para o **cluster 8** pode-se observar *bootstrap* de 84 nos bovinos ali posicionados, 2308 (coleta 1) e os três clones do bovino 2318 (coleta 2).

O **cluster 12** apresentou *bootstrap* de 62 em relação ao **cluster 13**, que agrupa três sequências dos bovinos de Itú, sendo elas o bovino 2287 (coleta 2), 2318 (coleta 4) e 2261 (coleta 4). Estes se posicionaram próximos a sequências encontradas no Pantanal Sul-matogrossense (MK030578), em Minas Gerais (JX844213 e JX844206), Rio de Janeiro (KJ398365) e México (JN564642). Dentro do **cluster 13** observou-se que a repetição **I** apareceu nas três sequências, segundo o programa *RepeatAnalyzer*.

Duas sequências se posicionaram no **cluster 17**, que teve *bootstrap* de 99, sendo elas a do bovino 2290 (coleta 1) e 2318 (coleta 1). Segundo o programa de classificação de genótipos as repetições **16** e **F** foram comuns entre estas sequências. Outras sequências de bovinos se posicionaram logo abaixo, formando clusters individuais, o bovino 2272 (coleta 2), 2278 (coleta 2) e 2295 (coleta 2), tendo como *bootstrap* 80, 93 e 74, respectivamente.

Uma sequência clonada do bovino 2295 (coleta 2) se posicionou próximo a *A. marginale* encontrada no Paraná (AY998121), com 98 de *bootstrap*, formando o **cluster 23**. Logo abaixo, no **cluster 24**, encontram-se as sequências dos bovinos 2243 (coleta 2), 2295 (coleta 3) e 2287 (coleta 1), assim como uma sequência proveniente do clone do bovino 2272 (coleta 4). Todas as sequências posicionadas no **cluster 24** apresentaram seus respectivos genótipos, tendo em comum a repetição **18** entre todos eles.

Em suma, constatou-se uma distribuição heterogênea entre as sequências de *msp1α* de *A. marginale* obtidas em bovinos de corte da cidade de Itú, São Paulo, porém pode-se observar que as sequências com mesmas repetições em seus genótipos posicionaram-se próximas. Houve a formação de oito clusters com sequências agrupadas, além de 4 clusters com sequências isoladas.

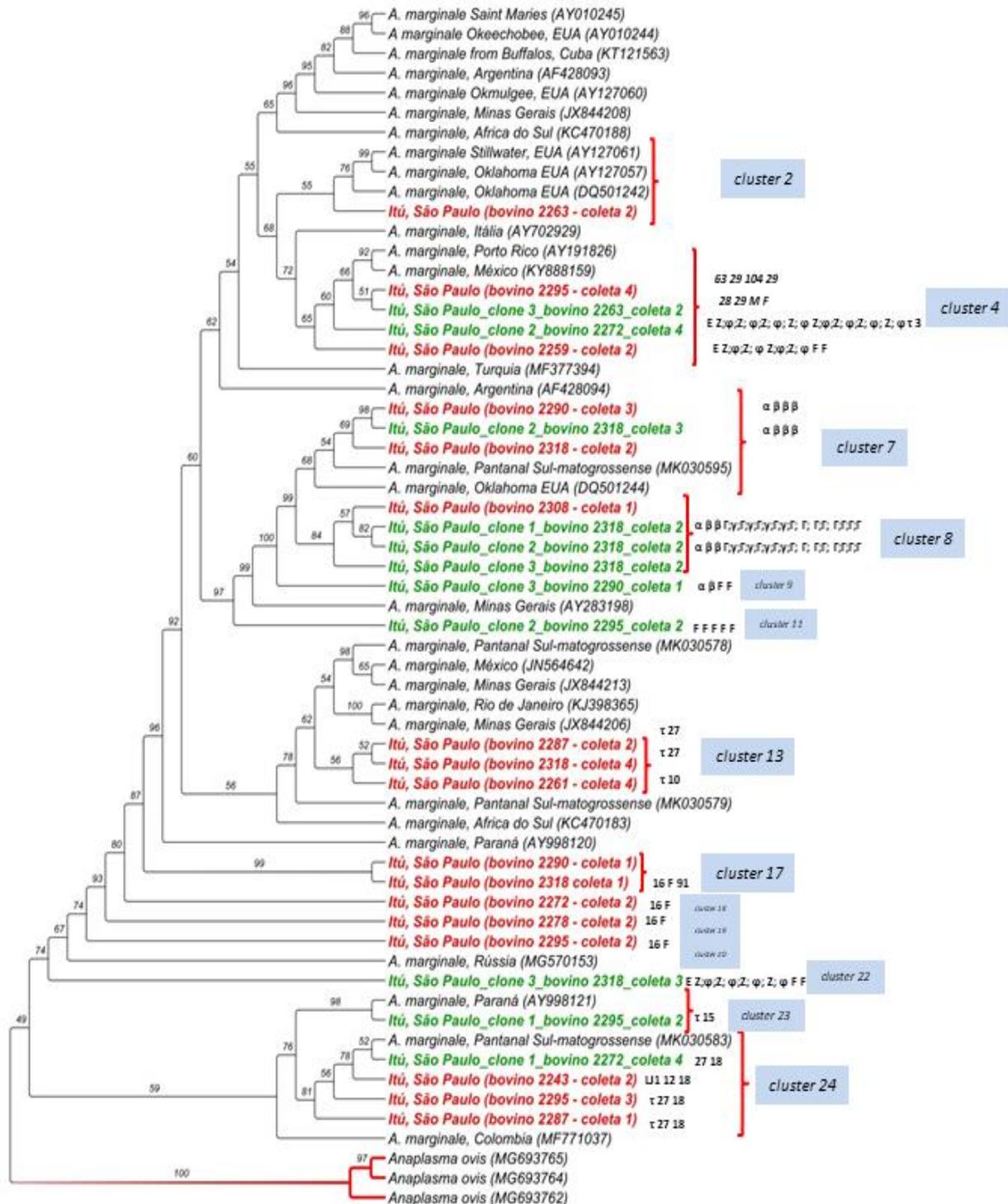


Figura 6. Árvore filogenética com seqüências do gene *msp1a* de *A. marginale*. A árvore foi construída utilizando o método probabilístico de Máxima Verossimilhança (MV) e modelo evolutivo TN+F+G4 com seqüências de *A. marginale* detectadas em bovinos de corte proveniente de uma fazenda na cidade de Itú, estado de São Paulo. Estão apresentadas seqüências de *A. marginale* de outros países e também de estados brasileiros. Os números de acesso no GenBank estão apresentados ao lado das seqüências, entre parênteses. Os clusters contendo as seqüências do presente estudo foram divididos numericamente, seguindo a ordem de posicionamento dos demais clusters.

5.3. Soropositividade para *A. marginale* pelo Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA)

O teste sorológico iELISA revelou a presença de anticorpos IgG anti-*A. marginale* em 22,5% (18/80) das amostras de soro bovino no teste conduzido com antígeno total. Quando usada proteína recombinante de superfície MSP5 a porcentagem de soroprevalência foi de 2,5% (2/80) (**Tabela 5**)

Tabela 5. Distribuição dos animais soropositivos na pesquisa de anticorpos IgG anti *A. marginale* usando antígeno total e a proteína recombinante de superfície (MSP5) e a quantificação média no ensaio de qPCR por colheita.

Colheita	Soropositivos para IgG anti <i>A. marginale</i> (antígeno total)	Soropositivos para IgG anti <i>A. marginale</i> (MSP5)	Quantificação média na qPCR (<i>msp1β</i> /uL)
1	15% (3/20)	0% (0/20)	3.28x10 ⁵
2	40% (8/20)	0% (0/20)	3.23x10 ³
3	25% (5/20)	5% (1/20)	2.35x10 ⁵
4	10% (2/20)	5% (1/20)	1.50x10 ⁵
Total	22,5% (18/80)	2,5% (2/80)	

6. DISCUSSÃO

A anaplasnose bovina é uma das enfermidades mais importantes atualmente devido a seu impacto negativo sobre a produção de carne e leite no mundo, causando grandes perdas econômicas para os produtores (KOCAN et al., 2010). Dessa forma, faz-se necessário conhecer melhor os mecanismos utilizados pelo agente etiológico da doença. Este estudo é o primeiro realizado com bovinos da raça Angus, onde encontramos uma alta diversidade genética e evidência de superinfecção por estirpes de *A. marginale* em bovinos de corte localizados na cidade de Itú, estado de São Paulo. No Brasil, estudos já foram conduzidos a fim de identificar a presença da bactéria em rebanhos de leite (MACHADO et al., 2015; SILVA et al., 2015; 2016) e de corte (VIDOTTO et al., 2006; DE SOUZA-RAMOS et

al., 2019) em diferentes estados, como em São Paulo (SILVA et al., 2016), no Rio de Janeiro (SILVA et al., 2015), no Paraná (VIDOTTO et al., 2006), em Minas Gerais (POHL et al., 2013) e no Mato Grosso do Sul (DE SOUZA-RAMOS et al., 2019), sendo este último o primeiro estudo em gado de corte nesta região do Brasil.

Os resultados obtidos na qPCR mostraram positividade de 100% das amostras de sangue de bovinos de corte para *A. marginale* utilizando como marcador o gene *msp1β*. A técnica de qPCR para o referido gene se mostra altamente específica, não apresentando reações cruzadas com outros patógenos (CARELLI et al., 2007). Comparando com as taxas de positividade de outros estudos conduzidos no Brasil, utilizando o mesmo protocolo, observamos resultados com taxas de porcentagem variadas. Em São Paulo, foi encontrada 80,4% de positividade em bezerros na cidade de Taiacu (SILVA et al., 2016). Machado et al. (2015) obtiveram 94% de positividade para o agente em vacas leiteiras de Lins, São Paulo e 38% positivas em Mambaí, estado de Goiás. Nos animais do presente estudo, a quantificação média ficou entre 10^3 e 10^7 cópias de fragmento de *msp1β* / μ L de DNA, sendo que alguns animais, da raça Angus, apresentavam sinais clínicos. Entretanto, bovinos de outras raças como o Nelore, por exemplo, mostram-se menos susceptíveis à *A. marginale*. No Pantanal Sul-matogrossense, bovinos de corte Nelore com riquettsemia média de $1,3 \times 10^6$ DNA/ μ L para bezerros e $3,9 \times 10^4$ DNA/ μ L para vacas não apresentavam sintomatologia clínica e foram considerados não anêmicos (DE SOUZA-RAMOS et al., 2019). Silva et al. (2015) ao amostrarem, no Rio de Janeiro, 20 animais provenientes de cruzamento entre *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*, observaram riquettsemia média nos bovinos com infecção crônica entre $2,06 \times 10^3$ DNA/ μ L e $8,76 \times 10^5$ DNA/ μ L, sendo que os animais não apresentavam sinais clínicos de anaplasmose. Comparando estas médias de riquettsemia e, levando em conta as diferenças de adaptação ao clima entre as raças bovinas, sugerimos que os bovinos da raça Angus, deste trabalho, são mais susceptíveis à *A. marginale* do que bovinos de outras raças. A infestação por carrapatos também pode ter contribuído para estes resultados. Os bovinos da raça Angus são considerados mais susceptíveis à infestação por carrapatos, ao contrário dos bovinos da raça Nelore. Estes possuem glândulas sebáceas que produzem

substância repelente, além de possuírem mais mastócitos e eosinófilos, que garantem uma menor susceptibilidade a *A. marginale*.

Com base no gene *msp1 α* , o qual mostra-se como principal marcador de estabilidade genética na identificação geográfica da bactéria (SILVA et al., 2016), foi possível observar grande diversidade de estirpes encontradas nos bovinos amostrados. Diferente do que foi visto no Pantanal sul-matogrossense (DE SOUZA-RAMOS et al., 2019) e em Taiaçu, São Paulo (SILVA et al., 2016), localidades onde o genótipo mais comumente encontrado foi o E, no presente trabalho notamos a presença de diferentes genótipos, entre eles o G, F, C e, com uma maior frequência, o genótipo H (**Figura 7**). Nenhum dos animais amostrados era importado. Desta forma, pode-se inferir que a área geográfica e a raça dos animais podem ser fatores determinantes para esta diferença entre as frequências dos genótipos encontrados. Pela classificação de genótipo proposta por Estrada-Peña et al., (2009) também foi possível observar diferentes genótipos nas amostras entre as quatro colheitas. Estes genótipos, diferentes a cada colheita, podem indicar um alto nível de mutação da bactéria *A. marginale* ou, ainda, uma alta variabilidade da bactéria presente nos bovinos da região estudada devido às proteínas de superfície MSP2 e MSP3. A MSP2 é codificada por grandes famílias polimórficas de múltiplos genes na espécie *A. marginale*. Com essa característica a proteína favorece a persistência da bactéria no organismo do hospedeiro (DE LA FUENTE et al., 2001; BRAYTON et al., 2005; BATTILANI et al., 2017).

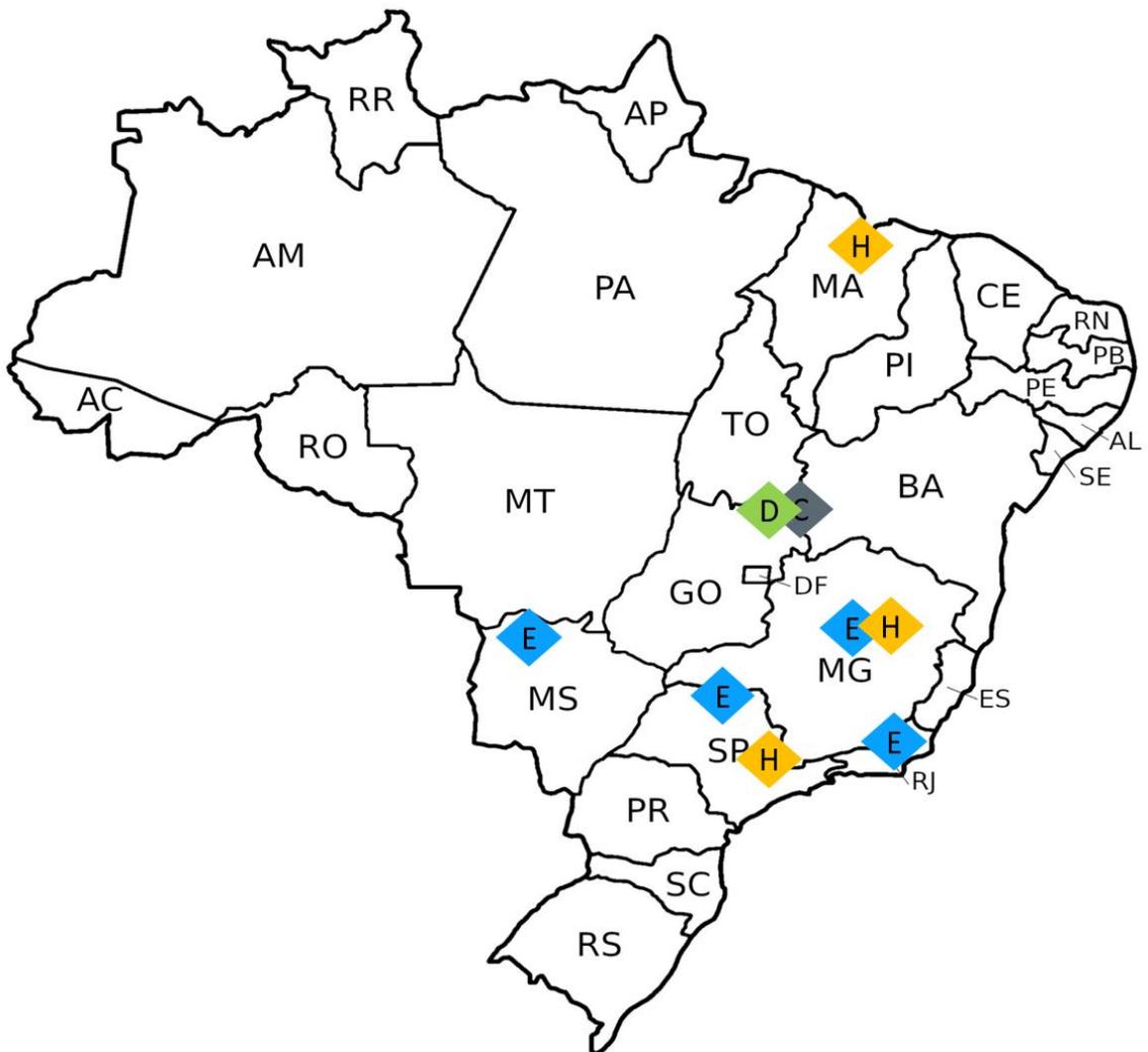


Figura 7. Mapa com estudos conduzidos no Brasil com a classificação de genótipos segundo Estrada-Peña et al. (2009). Trabalhos de: Taiacú – SP (Silva et al., 2016); Pantanal Sul-matogrossense (Souza-Ramos et al., 2019); Mambaí – GO (Machado et al., 2015); Lins – SP (Machado et al., 2015); Rio de Janeiro - RJ (Silva et al., 2015); São Luís – MA (Gomes et al., 2020 – em andamento); Minas Gerais (Pohl et al., 2013).

A inferência filogenética feita para este estudo nos deu algumas informações que podem ser levadas em consideração, como por exemplo: as estirpes, sendo elas sequências clonadas e não clonadas, que continham repetições em comum se posicionaram próximas na árvore filogenética. Além disto, algumas das sequências ficaram dispostas próximas a sequências provenientes dos Estados Unidos, Porco Rico e México. Silva et al., (2015) também obtiveram estirpes próximas

filogeneticamente de sequências identificadas em Porto Rico. Outros clusters posicionaram-se próximos à sequências de Minas Gerais, Paraná e do Pantanal - Sul Matogrossense. Em Taiacu, três estirpes foram submetidas à inferência filogenética e suas posições foram próximas a sequências de Minas Gerais, São Paulo e Argentina (SILVA et al., 2016). Apesar da inferência filogenética contendo dados de várias regiões não ser o mais indicado, as informações nelas contidas podem nos dar uma ideia de como as estirpes se posicionam em cada localidade.

Pela técnica de clonagem identificamos diferentes estirpes de *A. marginale* presentes em um mesmo bovino em uma determinada colheita. Segundo Ueti et al., (2012) tal fenômeno é chamado de superinfecção (ou coinfecção), por meio do qual uma segunda estirpe, geneticamente distinta da primeira, infecta um animal que já desenvolveu uma resposta imunológica para a estirpe primária. Notamos esta nova infecção nos animais estudados, pois estes apresentaram de 1 a 3 repiques da doença ao longo dos meses observados. Animais que eram tratados e posteriormente apresentaram repique da doença podem ter sido infectados por uma estirpe distinta daquela anterior ao tratamento ou, então, uma estirpe primária pode ter sofrido uma mutação e se transformado em uma nova estirpe. Vale ressaltar que os animais, durante as colheitas, estavam infestados por carrapatos (dados não mostrados), possibilitando a infecção, de maneira contínua, por novas estirpes. Também Ueti et al. (2012) conseguiram confirmar a hipótese de que a superinfecção seria mais comum em regiões tropicais e em animais naturalmente infectados. Em seu trabalho, tais autores compararam amostras provenientes de regiões temperadas e tropicais. Usando o gene *msp1 α* como marcador, mais de 95% dos animais da região tropical continham mais de um genótipo, indicando superinfecção. No Rio de Janeiro, foi possível observar esta mesma tendência, onde os bovinos apresentaram uma alta diversidade genética do gene *msp1 α* ao longo de seus meses de vida (SILVA et al., 2015). A clonagem, seguida pelo sequenciamento de produtos de PCR, são ensaios importantes para a obtenção de resultados concretos para o gene *msp1 α* , pois assim é possível saber se há a presença de múltiplas infecções em cada animal (HOVE et al., 2018). Segundo Hove et al. (2018), havia mais de um genótipo de *A. marginale* circulando entre os bovinos amostrados em nove províncias da África do Sul, constatando que os genótipos circulam entre os

rebanhos de cada província e que novas repetições surgem, de maneira independente, em bovinos de cada região.

Durante a infecção por *A. marginale* no bovino, o agente parasita exclusivamente os eritrócitos, os quais são, em um segundo momento, fagocitados pelos macrófagos esplênicos. O sistema imune inato é responsável pela primeira resposta à presença do patógeno e, logo em seguida, os antígenos do patógeno são apresentados aos linfonodos, que por sua vez irão ativar células B e T para que a resposta adaptativa seja feita. Há indícios de que patógenos podem imunossuprimir as respostas dos linfonodos do animal infectado, causando uma perda de linforreatividade e, por sua vez, incapacitando a resposta celular adaptativa (BROWN, 2012). É conhecido que bovinos que apresentam uma infecção aguda por *A. marginale* desenvolvem uma infecção persistente com bacteremias variando entre 10^2 a 10^7 de *A. marginale* por microlitro de sangue. Devido à natureza deste agente, de não se replicar dentro de células que expressam moléculas de MHC, hipotetiza-se que a proteção para esta infecção demande tanto da resposta humoral (anticorpos), quanto da resposta celular, através de células T auxiliares (CD4+) (HAN et al., 2010; BROWN, 2012). Em sua revisão, Brown (2012) apresentou estudos onde foi possível observar a queda da resposta por células T CD4+ depois da infecção, assim como a falha em estabelecer uma memória celular estável durante a infecção (ABBOTT et al., 2005; HAN et al., 2008; 2010). Isto nos faz acreditar que os altos níveis circulantes de antígenos de *A. marginale* podem provocar uma supressão no sistema imune adaptativo, levando o bovino a uma infecção persistente. Além disto, variações nas proteínas de superfície MSP2, MSP3 e MSP1 α também têm um papel importante na persistência do agente em bovinos (PALMER et al., 2009). Sabe-se que bovinos infectados com *A. marginale* não apresentam uma imunossupressão generalizada e, tampouco, alterações no número de leucócitos e linfócitos, porém pode ocorrer a supressão de células T antígeno-específicas (BROWN, 2012).

Neste trabalho o teste sorológico de ELISA indireto mostrou baixa soropositividade dos animais, uma vez que os bovinos não apresentaram um alto título de anticorpos anti-*A. marginale*, revelando uma resposta humoral reduzida. Este resultado, juntamente com os constantes repiques da doença nos bovinos

amostrados, revela a presença de uma infecção persistente, onde a proteção imune humoral pareça não ter sido eficiente nos animais. Partindo para as possíveis causas desta resposta imune deficitária, podemos sugerir algumas hipóteses, como a não expressão de alelos do complexo antigênico dos linfócitos bovinos (BoLA). Os genes que fazem parte deste complexo medeiam à apresentação de antígenos para as células T específicas (ANDERSON, 1990; LEWIN et al., 1999). A não expressão de seus alelos poderia acarretar em uma resposta celular deficitária, onde a apresentação do antígeno não ocorreria e assim os animais não desenvolveriam imunidade contra a bactéria.

O ensaio de iELISA utilizando antígeno total para a sensibilização das placas mostrou baixa soropositividade, não corroborando com estudos prévios feitos pelo nosso grupo de pesquisa e utilizando o mesmo antígeno total, pertencente ao nosso laboratório (SILVA et al., 2015; 2016; DE JESUS FERNANDES et al., 2019, DE SOUZA-RAMOS et al., 2019). Braz Jr et al. (2000) desenvolveram um protocolo para a detecção de anticorpos anti-*A. marginale* em soros de bovinos utilizando antígeno total. O que observou-se foi uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 94,87% da técnica, sendo positivos todos os soros de bovinos naturalmente infectados. Utilizando-se a proteína recombinante MSP5 como antígeno, houve positividade muito baixa, resultados não observados em outros trabalhos (KNOWLES et al., 1996; DE ECHAIDE et al., 1998; MARANA et al., 2009). Entretanto, variações de ensaios sorológicos se mostram eficazes para o diagnóstico de anaplasmose, como o ELISA competitivo, que utilizando uma proteína MSP5 recombinante (rMSP5-PR1) e anticorpos monoclonais, mostrou sensibilidade de 98,9% e especificidade de 96,4% (MARANA et al., 2009). O gene *mSP5* possui antigenicidade e conservação dos seus epítomos, consequentemente é bastante utilizado na detecção sorológica de *A. marginale*. Visser et al. (1992) já haviam demonstrado a presença de um único gene conservado na proteína MSP5, diferente do que observa-se em outras proteínas como a MSP1 β , MSP2 e MSP3.

Desta forma, hipotetizamos que a *A. marginale*, quando presente no animal, imunossuprime a sua resposta. Quando comparamos com os estudos conduzidos por Abbott et al., (2005) e Han et al., (2008, 2010), vemos que a presença da

bactéria pode interferir na resposta adaptativa celular, impedindo que o animal combata, de maneira eficaz, a infecção.

7. CONCLUSÕES

Uma alta diversidade genética de *A. marginale* foi observada em um rebanho de corte da raça Angus em uma propriedade na cidade de Itú, estado de São Paulo, com episódios frequente de surtos de anaplasmose clínica e com a descrição de novas estirpes, não relatadas anteriormente. Ademais, o fenômeno de superinfecção foi demonstrado nos animais amostrados, com mais de uma estirpe circulante em um mesmo animal. A soropositividade indicada pelo iELISA utilizando antígeno total e a proteína de superfície MSP5 para *A. marginale* foi baixa, apesar dos animais serem positivos nos ensaios de qPCR, mostrando assim uma possível imunossupressão causada pela presença do patógeno.

8. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, J.R.; PALMER, G.H.; KEGERREIS, K.A.; HETRICK, P.F.; HOWARD, C.J.; HOPE, J.C.; BROWN, W.C. Rapid and long-term disappearance of CD4+ T lymphocyte responses specific for *Anaplasma marginale* major surface protein-2 (MSP2) in MSP2 vaccinates following challenge with live *A. marginale*. The Journal of Immunology, v. 174, n. 11, p. 6702-6715, 2005.
- ALAMZÁN, 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, 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, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- AKTAS, M.; ÖZÜBEK, S. Outbreak of anaplasmosis associated with novel genetic variants of *Anaplasma marginale* in a dairy cattle. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, v. 54, p. 20-26, 2017.
- ANDERSSON, L. Major histocompatibility genes in cattle and their significance for immune response and disease susceptibility. Major histocompatibility genes in cattle and their significance for immune response and disease susceptibility., p. 213-226, 1990.
- ANDRADE, G.M.; MACHADO, R.Z.; VIDOTTO, M.C.; VIDOTTO, O. Immunization of bovines using a DNA vaccine (pcDNA3.1/MSP1b) prepared from the Jaboticabal strain of *Anaplasma marginale*. Annals New York Academy of Sciences, New York, v.1026, n.1, p.257-266, 2004
- 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 Veterinaria, v. 4, n. 2, 1995.
- ARULKANTHAN, A.; BROWN, W.C.; McGUIRE, T.C.; KNOWLES, D.P. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressin gene *msp1a* of *Anaplasma marginale*. Infection and Immunity, v. 67, p. 3481-3287, 1999.
- AUBRY, P.; GEALE, D.W. A review of bovine anaplasmosis. Transboundary and emerging diseases, v. 58, n. 1, p. 1-30, 2011.

- BARRÉ, N.; UILENBERG, G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. *Revue scientifique et technique*, v. 29, n. 1, p. 149, 2010.
- BATTILANI, M.; DE ARCANGELI, S.; BALBONI, A.; DONDI, F. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 49, p. 195-211, 2017.
- BATTSETSEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F.G.; INOUE, N.; ALHASSAN, A.; KANNO, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, v. 107, n. 4, p. 351-357, 2002.
- BELL-SAKYI, L.; PALOMAR, A.M.; BRADFORD, E.L.; SHKAP, V. Propagation of the Israeli vaccine strain of *Anaplasma centrale* in tick cell lines. *Veterinary microbiology*, v. 179, n. 3-4, p. 270-276, 2015.
- BENSON, D.A.; MIZRACHI, I.K.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; RAPP, B.A.; WHEELER, D.I. GenBank., *Nucleic Acids Research Oxford*, v. 30, n. 1, p. 17-20, 2002.
- 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*, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003.
- BRASIL, IBGE. Censo Agropecuário, 2017. **Rio de Janeiro**, 2016.
- BRAYTON, K.A.; KAPPMEEER, L.S.; HERNDON, D.R.; DARK, M.J.; TIBBALS, D.L., PALMER, G.H., MCGUIRE, T.C.; KNOWLES, D.P., JR. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 3, p. 844-849, 2005.
- BRAYTON, K.A.; PALMER, G.H.; BROWN, W.C. Genomic and proteomic approaches to vaccine candidate identification for *Anaplasma marginale*. *Expert review of vaccines*, v. 5, n. 1, p. 95-101, 2006.

- BRAZ JR, C.J.; RIBEIRO, M.F.B.; LIMA, J.D.; PASSOS, L.M.F. Development of an ELISA system for Detection of Anti-*Anaplasma marginale* Antibodies in cattle in Brazil. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, v. 47, n. 4, p. 241-248, 2000.
- 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 and immunity*, v. 66, n. 11, p. 5406-5413, 1998.
- BROWN, W.C. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: implications for bacterial persistence. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 35, n. 3, p. 241-252, 2012.
- CABEZAS-CRUZ, A.; PASSOS, L. M. F.; LIS, K.; KENNEIL, R.; VALDÉS, J. J.; FERROLHO, J.; TONK, M.; POHL, A. E.; GRUBHOFFER, L.; ZWEYGARTH, E.; SHKAP, V.; RIBEIRO, M. F. B.; ESTRADA-PEÑA, A; KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J. Functional and immunological relevance of *Anaplasma marginale* major surface protein 1 sequence and structural analysis. *Plos One*, v. 8, n. 6, p. 1-13, 2013.
- CABEZAS-CRUZ, A.; DE LA FUENTE, J. *Anaplasma marginale* major surface protein 1a: a marker of strain diversity with implications for control of bovine anaplasmosis. *Ticks and tick-borne diseases*, v. 6, n. 3, p. 205-210, 2015.
- CANGUSSU, A.S R.; MARIÚBA, L.A.M.; LALWANI, P.; PEREIRA, K.D.E.; ASTOLPHI-FILHO, S.; ORLANDI, P.P.; EPIPHANIO, S.; VIANA, K.F.; RIBEIRO, M.F.B.; SILVA, H.M.; MARINHO, C.R.; NOGUEIRA, P.A. A hybrid protein containing MSP1a repeats and Omp7, Omp8 and Omp9 epitopes protect immunized BALB/c mice against anaplasmosis. *Veterinary research*, v. 49, n. 1, p. 6, 2018.
- 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*, v. 124, n.1-2, p. 107-114, 2007.
- CARINI, A. O. *Anaplasma marginale* em São Paulo. *Rev. Med*, 1910.
- CASTAÑEDA-ORTIZ, E.J.; UETI, M.W.; CAMACHO-NUEZ, M.; MOSQUEDA, J.J.; MOUSEL, M.R.; JOHNSON, W.C.; PALMER, G.H. Association of *Anaplasma*

marginale strain superinfection with infection prevalence within tropical regions. PLoS One, v. 10, n. 3, 2015.

CATANESE, H.N.; BRAYTON, K.A.; GEBREMEDHIN, A.H. RepeatAnalyzer: a tool for analysing and managing short-sequence repeat data. BMC genomics, v. 17, n. 1, p. 422, 2016.

CHEVILLON, C.; DE GARINE-WICHATITSKY, M.; BARRÉ, N.; DUCORNEZ, S.; DE MEEÛS, T. Understanding the genetic, demographical and/or ecological processes at play in invasions: lessons from the southern cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). Experimental and Applied Acarology, v. 59, n. 1-2, p. 203-218, 2013.

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

COSTA, S.C.L.; DE MAGALHÃES, V.C.S.; DE OLIVEIRA, U.V.; CARVALHO, F.S.; DE ALMEIDA, C.P.; MACHADO, R.Z.; MUNHOZ, A.D. Transplacental transmission of bovine tick-borne pathogens: frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic stability in the northeast of Brazil. Ticks and tick-borne diseases, v. 7, n. 2, p. 270-275, 2016.

CROSBY, F.L.; BRAYTON, K.A.; MAGUNDA, F.; MUNDERLOH, U.G.; KELLEY, K.L.; BARBET, A.F. Reduced Infectivity in cattle for an outer membrane protein mutant of *Anaplasma marginale*. Appl. Environ. Microbiol., v. 81, n. 6, p. 2206-2214, 2015.

DARLINGTON, P.B. Anaplasmosis in cattle (Galziete) found to exist in Kansas. N. Am. Vet, v. 7, n. 6, p. 39-41, 1926.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature methods, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012.

DE ECHAIDE, S.T.; KNOWLES, D.P.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; SUAREZ, C.E.; MCELWAIN, T.F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked

immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *Journal of clinical microbiology*, v. 36, n. 3, p. 777-782, 1998.

DE JESUS FERNANDES, S.; MATOS, C.A.; FRESCHI, C.R.; DE SOUZA RAMOS, I.A.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Diversity of *Anaplasma* species in cattle in Mozambique. *Ticks and tick-borne diseases*, v. 10, n. 3, p. 651-664, 2019.

DE LA FUENTE, J.; GARCIA GARCIA, J.C.; BLOUIN, E.F.; RODRÍGUEZ, S.D.; GARCIA, M.A.; KOCAN, K.M. Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Animal Health Research Reviews*, v. 2, n. 2, p. 163-174, 2001a.

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

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHIE, R.A.; GARCIA GARCIA, J.C.; RODRÍGUEZ, S.D.; GARCIA, 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* based on major surface protein sequences. *Veterinary microbiology*, v. 88, n. 3, p. 275-285, 2002.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHIE, R.A.; PRADO, T.; KOCAN, K.M. *Anaplasma marginale* msp1 α genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. *Journal of clinical microbiology*, v. 41, n. 4, p. 1609-1616, 2003.

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

DE LA FUENTE, J.; LEW, A.; LUTZ, H.; MELI, M.L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; MANGOLD, A.J.; ALMAZÁN, C.; NARANJO, V.; GORTÁZAR, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; GARCIA-PEREZ, A.L.; BARRAL, M.; OPORTO, B.; CECI, L.; CARELLI, G.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Animal health research reviews*, v. 6, n. 1, p. 75-89, 2005.

- DE LA FUENTE, J.; RUYBAL, P.; MTSHALI, M.S.; NARANJO, V.; SHUQING, L.; MANGOLD, A.J.; RODRÍGUEZ, S.D.; JIMÉNEZ, R.; VICENTE, J.; MORETTA, R.; TORINA, A.; ALMAZÁN, C.; MBATI, P.M.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; FARBER, M.; ROSARIO-CRUZ, R.; GORTAZAR, C.; KOCAN, K.M. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Veterinary microbiology*, v. 119, n. 2-4, p. 382-390, 2007.
- DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M.; Functional genomics and evolution of tick–*Anaplasma* interactions and vaccine development. *Veterinary parasitology*, v. 167, n. 2-4, p. 175-186, 2010.
- DE OLIVEIRA, A.A.; PEDREIRA, P.A.; DE ALMEIDA, M.F.R.S. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasmosose no estado de Sergipe. *Arq. bras. med. vet. zootec*, v. 44, n. 5, p. 377-86, 1992.
- DE SOUZA RAMOS, I.A.; HERRERA, H.M.; DE JESUS FERNANDES, S.; DO AMARAL, R.B.; ZANATTO, D.C.S.; DA SILVA, T.M.V.; HORTA, B.L.S.; CAMPOS, J.B.V.; ALVES, J.V.A.; MACEDO, G.C.; MACHADO, R.Z.; ANDRÉ, M.R. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in beef cattle in the Brazilian Pantanal. *Ticks and tick-borne diseases*, v. 10, n. 4, p. 805-814, 2019.
- DERINGER, J.R.; FORERO-BACERRA, E.G.; UETI, M.W.; TURSE, J.E.; FUTSE, J.E.; NOH, S.M.; PALMER, G.H.; BROWN, W.C. Identification of a T-cell epitope that is globally conserved among outer membrane proteins (OMPs) OMP7, OMP8, and OMP9 of *Anaplasma marginale* strains and with OMP7 from the *A. marginale* subsp. *centrale* vaccine strain. *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 24, n. 1, p. e00406-16, 2017.
- 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 the 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*, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.
- ERIKS, INGE S.; STILLER, D.; PALMER, G.H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *Journal of clinical microbiology*, v. 31, n. 8, p. 2091-2096, 1993.

- ESPINOZA, V.O.; VÁZQUEZ, J.E.S.; AGUILAR, M.D.; ORTIZ, M.Á.G.; ALARCÓN, G.J.C.; RODRÍGUEZ, S.D. *Anaplasma marginale*: lack of cross-protection between strains that share MSP1a variable region and MSP4. *Veterinary microbiology*, v. 114, n. 1-2, p. 34-40, 2006.
- ESTRADA-PEÑA, A.; NARANJO, V.; ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; MANGOLD, A.J.; KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J. Phylogeographic analysis reveals association of tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. *BMC biology*, v. 7, n. 1, p. 57, 2009.
- EWING, S.A. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: Proceedings of the 7th National Anaplasmosis Conference. Mississippi State University, Mississippi State, Miss. 1981. p. 395-423.
- EWING, C.A.; RUMSEY, D.H.; LANQBERG, A.F.; SANDLER, S.G. Immuno prophylaxis using intravenous Rh immunoglobulin should be standard practice when selected D-negative patients are transfused with D-positive Randon donor platelets, *Immuno-hematology*, Washington, v.14, n.4, p. 133-7, 1998.
- FAJARDO, F.A.A piroplasmose bovina no Rio de Janeiro. *Rev. Med*, v. 4, p. 18-30, 1901.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.
- FERREIRA, A.M.T.; SUZART, S.; VIDOTTO, O.; KNOWLES, D.P.; VIDOTTO, M.C. Use of repetitive DNA elements to define genetic relationships among *Anaplasma marginale* isolates. *FEMS microbiology letters*, v. 197, n. 2, p. 139-143, 2001.
- FOIL, L.D. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitology today*, v. 5, n. 3, p. 88-96, 1989.
- FONSECA, A.; BRAGA, A. Noções sobre a tristeza parasitaria dos bovinos [Piroplasmose, Anaplasmosis]. 1924.
- FRISCH, J.E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *International journal for parasitology*, v. 29, n. 1, p. 57-71, 1999.
- GEORGE, N.; BHANDARI, V.; SHARMA, P. Phylogenetic relationship and genotypic variability in *Anaplasma marginale* strains causing anaplasmosis in India. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 48, p. 71-75, 2017.

- 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*, v. 38, n. suppl_2, p. W14-W18, 2010.
- GOTZE, M.M.; NIZOLI, L.Q.; SILVA, S.S. Efeitos da oxitetraciclina na recomposição do hematócrito de vacas leiteiras durante surto de anaplasmoose bovina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 1, p. 92-95, 2008.
- GRAU, H.E.G.; CUNHA FILHO, N.A.D.; PAPPEN, F.G.; FARIAS, N.A.D. R. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 2, p. 189-193, 2013.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology*, v. 52, n. 5, p. 696-704, 2003.
- HAN, S.; NORIMINE, J.; PALMER, G.H.; MWANGI, W.; LAHMERS, K.K.; BROWN, W.C. Rapid deletion of antigen-specific CD4+ T cells following infection represents a strategy of immune evasion and persistence for *Anaplasma marginale*. *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 11, p. 7759-7769, 2008.
- HAN, S.; NORIMINE, J.; BRAYTON, K.A.; PALMER, G.H.; SCOLES, G.A.; BROWN, W.C. *Anaplasma marginale* infection with persistent high-load bacteremia induces a dysfunctional memory CD4+ T lymphocyte response but sustained high IgG titers. *Clin. Vaccine Immunol.*, v. 17, n. 12, p. 1881-1890, 2010.
- HOVE, P.; CHAISI, M.E.; BRAYTON, K.A.; GANESAN, H.; CATANESE, H.N.; MTSHALI, M.S.; MUTSHEMBELE, A.M.; OOSTHUIZEN, M.C.; COLLINS, N.E. Co-infections with multiple genotypes of *Anaplasma marginale* in cattle indicate pathogen diversity. *Parasites & vectors*, v. 11, n. 1, p. 5, 2018.
- JAIMES-DUEÑEZ, J.; TRIANA-CHÁVEZ, O.; MEJÍA-JARAMILLO, A.M. Genetic, host and environmental factors associated with a high prevalence of *Anaplasma marginale*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2018.
- KNOWLES, D.; DE ECHAIDE, S.T.; PALMER, G.; MCGUIRE, T.; STILLER, D.; MCELWAIN, T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, 1996.

- KOCAN, K.M. Development of *Anaplasma marginale* in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. 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 calves. *Journal of medical entomology*, v. 29, n. 4, p. 657-668, 1992.
- KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A.A.; MELÉNDEZ, R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.
- KOCAN, K.M.; 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*, v. 129, n. S1, p. S285-S300, 2004.
- KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E.F.; COETZEE, J.F.; EWING, S.A. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary parasitology*, v. 167, n. 2-4, p. 95-107, 2010.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in bioinformatics*, v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.
- LABRUNA, M.B.; KERBER, C.E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; DE WAAL, D.T.; GENNARI, S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 97, n. 1, p. 1-14, 2001.
- LAU, A.O.; CERECERES, K.; PALMER, G.H.; FRETWELL, D.L.; PEDRONI, M.J.; MOSQUEDA, J.; MCELWAIN, T.F. Genotypic diversity of merozoite surface antigen 1 of *Babesia bovis* within an endemic population. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 172, n. 2, p. 107-112, 2010.
- LEWIN, H.A.; RUSSELL, G.C.; GLASS, E.J. Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. *Immunological reviews*, v. 167, n. 1, p. 145-158, 1999.
- 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 of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. *Veterinary Parasitology*, v. 71, n. 1, p. 17-26, 1997.

MACHADO, R.Z.; SILVA, J.B.D.; 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*, v. 24, n. 4, p. 438-446, 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 Anaplasmataceae agents infecting the African buffalo *Syncerus caffer* from Marromeu Reserve in Mozambique. *Parasites & Vectors*, London, v. 9, n. 1, p. 454, 2016.

MADDER, M.; THYS, E.; GEYSEN, D.; BAUDOUX, C.; HORAK, I. *Boophilus microplus* ticks found in West Africa. *Experimental & applied acarology*, v. 43, n. 3, p. 233, 2007.

MADRUGA, C.R. Prevalência de *Anaplasma marginale* em três regiões do estado da Paraíba. CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINARIA EM LINGUA PORTUGUESA, 6., 1993, Salvador. Anais. Salvador: Comitê Permanente dos Congressos Internacionais de Medicina Veterinaria em Lingua Portuguesa, 1993.

MARANA, E.R.; KANO, F.S.; VICENTINI, J.C.; SPURIO, R.S.; RIBEIRO, M.; COELHO, A.L.; VIDOTTO, M.C.; VIDOTTO, O. Cloning, expression, molecular characterization of the MSP5 protein from PR1 strain of *Anaplasma marginale* and its application in a competitive enzyme-linked immunosorbent test. *Revista brasileira de parasitologia veterinária. Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, v. 18, n. 2, p. 5-12, 2009.

MASSARD, C.L.; FREIRE, R.B. Etiology, signs and diagnosis of bovine babesias in Brazil. *Hora Veterinaria*, 1985.

MCCALLON, B.R. Prevalence and economic aspects of anaplasmosis. In: *Proceedings of the 6th National Anaplasmosis Conference*. Heritage Press, Stillwater, Okla. . p. 1-3, 1973.

MTSHALI, M.S.; DE LA FUENTE, J.; RUYBAL, P.; KOCAN, K.M.; VICENTINE, J.; MBATI, P.A.; SHKAP, V.; BLOUIN, E.F.; MOHALE, N.E.; MOLOI, T.P., SPICKETT,

- A.M.; LATIF, A.A. Prevalence and genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains in cattle in South Africa. *Zoonoses and public health*, v. 54, n. 1, p. 23-30, 2007.
- NOH, S.M.; BRAYTON, K.A.; BROWN, W.C.; NORIMINE, J.; MUNSKE, G.R.; DAVITT, C.M.; PALMER, G.H. Composition of the surface proteome of *Anaplasma marginale* and its role in protective immunity induced by outer membrane immunization. *Infection and immunity*, v. 76, n. 5, p. 2219-2226, 2008.
- NOH, S.M.; BROWN, W.C. Adaptive immune responses to infection and opportunities for vaccine development (Anaplasmataceae). In: *Intracellular Pathogens II: Rickettsiales*. American Society of Microbiology, p. 330-365, 2012.
- OSTERKAMP, J.; WAHL, U.; SCHMALFUSS, G.; HAAS, W. Host-odour recognition in two tick species is coded in a blend of vertebrate volatiles. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 185, n. 1, p. 59-67, 1999.
- PALMER, G.H.; MCELWAIN, T.F. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Veterinary parasitology*, v. 57, n. 1-3, p. 233-253, 1995.
- PALMER, G.H.; ABBOTT, J.R.; FRENCH, D.M.; MCELWAIN, T.F. Persistence of *Anaplasma ovis* infection and conservation of the msp-2 and msp-3 multigene families within the genus *Anaplasma*. *Infection and immunity*, v. 66, n. 12, p. 6035-6039, 1998.
- PALMER, G.H.; RURANGIRWA, F.R.; KOCAN, K.M.; BROWN, W.C. Molecular basis for vaccine development against the Ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitology Today*, Amsterdam v. 15, p. 281–286, 1999
- PALMER, G.H.; BROWN, W.C.; RURANGIRWA, F.R. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. *Microbes and infection*, v. 2, n. 2, p. 167-176, 2001.
- PALMER, G.H.; BANKHEAD, T.; LUKEHART, S.A. 'Nothing is permanent but change'†—antigenic variation in persistent bacterial pathogens. *Cellular microbiology*, v. 11, n. 12, p. 1697-1705, 2009.
- POHL, A.E.; CABEZAS-CRUZ, A.; RIBEIRO, M.F.B.; SILVEIRA, J.A.G.D.; 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*, v. 22, n. 1, p. 129-135, 2013.

- POTGIETER, F.T. Epizootiology and control of anaplasmosis in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 50, n. 4, p. 367-372, 1979.
- POTGIETER, F.T.; STOLTSZ, W.H. Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa. *Anaplasmoses*, v. 1, p. pp. 408-430, 1994.
- QUIROZ-CASTAÑEDA, R.E; AMARO-ESTRADA, I.; RODRÍGUEZ-CAMARILLO, S.D. *Anaplasma marginale*: diversity, virulence, and vaccine landscape through a genomics approach. *BioMed research international*, v. 2016, 2016.
- RAR, V.; GOLOVLJOVA, I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus Neoehrlichia*” bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 11, n. 8, p. 1842-1861, 2011.
- RIBEIRO, M.F.B.; REIS, R. Prevalência da anaplasnose em quatro regiões do estado de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v. 33, n. 1, p. 57-62, 1981.
- RIBEIRO, M.F.B.; FACURY-FILHO, E.J.; PASSOS, L.M.F.; SATURNINO, H.M.; MALACCO, M.A.F. Uso de inóculo padronizado de *Anaplasma marginale* e da quimioprofilaxia no controle da anaplasnose bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 1, p. 21-26, 2003.
- RISTIC, M. Bovine anaplasmosis. *Parasitic protozoa*, v. 4, p. 235-249, 1977.
- RUYBAL, P.; MORETTA, R.; PEREZ, A.; PETRIGH, R.; ZIMMER, P.; ALCARAZ, E.; ECHAIDE, I.; DE ECHAIDE, S.T.; KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; FARBER, M. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. *Veterinary parasitology*, v. 162, n. 1-2, p. 176-180, 2009.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SCOLES, G.A.; BROCE, A.B.; LYSYK, T.J.; PALMER, G. H. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Journal of medical entomology*, v. 42, n. 4, p. 668-675, 2005.
- SEO, M.G.; OUH, I.O.; LEE, H.; GERALDINO, P.J.L.; RHEE, M.H.; KWON, O.D.; KWAK, D. Differential identification of *Anaplasma* in cattle and potential of cattle to

serve as reservoirs of *Anaplasma capra*, an emerging tick-borne zoonotic pathogen. *Veterinary microbiology*, v. 226, p. 15-22, 2018.

SILVA, J.B.; FONSECA, A.H.; BARBOSA, J.D.; CABEZAS-CRUZ, A.; DE LA FUENTE, J. Low genetic diversity associated with low prevalence of *Anaplasma marginale* in water buffaloes in Marajó Island, Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, v. 5, n. 6, p. 801-804, 2013.

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

SILVA, J.B.; GONÇALVES, L.R.; DE MELLO VARANI, A.; 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 And Tick-Borne Diseases*, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 499-507, 2015.

SILVA, J.B.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. *Ticks And Tick-Borne Diseases*, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 20-25, 2016.

SMITH, T.; KILBORNE, F.L. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. US Government Printing Office, 1893.

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

STICH, R.W.; KOCAN, K.M.; PALMER, G.H.; EWING, S.A.; HAIR, J.A.; BARRON, S.J. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. *American journal of veterinary research*, v. 50, n. 8, p. 1377-1380, 1989.

STÖVER, B.C.; MÜLLER, K.F. TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC bioinformatics*, v. 11, n. 1, p. 7, 2010.

STUEN, S.; GRANQUIST, E.G.; SILAGHI, C. *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 3, p. 31, 2013.

SUAREZ, C.E.; NOH, S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary parasitology*, v. 180, n. 1-2, p. 109-125, 2011.

THEILER, A. *Anaplasma marginale* (gen. and spec. nov.): The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. Pretoria: Government Printing and Stationary Office, 1910.

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

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

VIDOTTO, O.; MARANA, E.R.M. Anaplasmosse bovina: aspectos epidemiológicos, clínicos e controle. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 20, n. 1, p. 98-106, 1999.

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

VISSER, E.S.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; DAVIS, W.C.; SHKAP, V.; PIPANO, E.; KNOWLES, D.P. The *Anaplasma marginale* *msp5* gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infection and Immunity*, v. 60, n. 12, p. 5139-5144, 1992.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. (Ed.). *Schalm's veterinary hematology*. John Wiley & Sons, 2011.

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

ZAUGG, J.L. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. *American journal of veterinary research*, v. 46, n. 3, p. 570-572, 1985.