

**UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**Caracterização molecular de *Anaplasma marginale*
e variáveis associadas a infecção em bovinos
naturalmente infectados do Estado do Rio de
Janeiro**

Carolina Melo de Souza Nunes

2025



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

**Caracterização molecular de *Anaplasma marginale* e variáveis
associadas a infecção em bovinos naturalmente infectados do
Estado do Rio de Janeiro**

CAROLINA MELO DE SOUZA NUNES

Sob a orientação da Professora Doutora
Bruna de Azevedo Baêta

E coorientação de
Argemiro Sanavria
Matheus Dias Cordeiro

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências
Veterinárias**, no Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Veterinárias.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N972c

Nunes , Carolina Melo de Souza, 28/02/1996-
Caracterização molecular de Anaplasma marginale e
variáveis associadas a infecção em bovinos
naturalmente infectados do Estado do Rio de Janeiro
/ Carolina Melo de Souza Nunes . - Niterói, 2025.
43 f.

Orientadora: Bruna de Azevedo Baêta .
Coorientador: Matheus Dias Cordeiro.
Coorientador: Argemiro Sanavria.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Ciências Veterinárias , 2025.

1. Anaplasmosse. 2. Diversidade genética . 3.
Produção bovina. I. Baêta , Bruna de Azevedo, 1984-,
orient. II. Cordeiro, Matheus Dias, -, coorient. III.
Sanavria, Argemiro, -, coorient. IV Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Ciências Veterinárias . V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 6574/2025 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.070481/2025-18

Seropédica-RJ, 05 de dezembro de 2025.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CAROLINA MELO DE SOUZA NUNES

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra** em Ciências,
no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05/12/2025

(Assinado digitalmente em 10/12/2025 17:37)

BRUNA DE AZEVEDO BAETA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)

Matrícula: ###475#9

(Assinado digitalmente em 18/12/2025 23:22)

MARISTELA PECKLE PEIXOTO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)

Matrícula: ###034#8

(Assinado digitalmente em 11/12/2025 15:10)

ERICA CRISTINA ROCHA ROIER

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.377-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **6574**, ano: **2025**,
tipo: **ATA**, data de emissão: **05/12/2025** e o código de verificação: **c488faa30a**

*Dedico esse trabalho à minha mãe,
assim como todas as minhas conquistas.
Sua força me fez forte.*

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento será sempre à minha mãe, a mulher mais forte do mundo e minha maior inspiração. Devo a ela todas as minhas conquistas. Eu não seria nada do que sou se não fosse por seus esforços e abdições, que me fizeram crescer, ter caráter e chegar até aqui. Obrigada, mãe, por acreditar na minha capacidade e me impulsionar, sozinha, a ser melhor durante toda a minha vida.

Quero agradecer ao meu namorado, Davi, que é também uma forma que a vida arrumou de me lembrar todos os dias o quanto eu tenho sorte. Tudo seria muito mais difícil se não fosse por esse homem incrível me incentivando e me dando todo o suporte e amor possíveis.

Um agradecimento mais que especial à Olivia Zen, que me ajudou a entrar e a sair do mestrado, principalmente. Foi quem me ensinou grande parte do que sei sobre biologia molecular e quem esteve comigo em absolutamente todos os momentos, difíceis ou não, desses dois anos. Toda a experiência da pós-graduação foi vivida de forma muito única graças a essa amizade, apoio mútuo e cumplicidade.

À minha família, especialmente à minha irmã Manuela, que me incentiva, sem nem perceber, a ser minha melhor versão e um bom exemplo para ela. À minha avó Regina, à minha avó Vera, ao meu padrasto, ao meu padrinho, à minha irmã Giovanna, minha tia Simone, ao Roney e a todos que participaram do meu processo de crescimento.

À minha orientadora, Bruna Baêta, por ter aceitado me orientar e acreditado na minha capacidade, até muito mais do que eu mesma. Também aos meus coorientadores, Matheus Cordeiro e Argemiro Sanavria, por confiarem no meu potencial e me impulsionarem desde o início. Os três são profissionais de excelência e inspiração para mim.

Quero agradecer a toda a equipe do LEIPH, que de alguma forma me auxiliou e compartilhou os dias comigo. Principalmente aos meus amigos Karoline, Gabriel, Isadora e à minha estagiária Isabella que tornaram as coisas mais leves e me ajudaram tanto! E ao Jonathan, obrigada pela força na finalização do meu artigo e dissertação e por me tranquilizar em vários momentos dessa reta final, você foi essencial.

A todos os meus amigos da vida, que me dão muita credibilidade e estão comigo há anos nessa jornada, tornando tudo mais suportável. Sou muito privilegiada por todas as pessoas que me cercam.

Aos animais que participaram dessa pesquisa e da minha formação, sem eles nada disso seria possível.

Agradeço à CAPES, ao CNPq e à FAPERJ por tornarem esta pesquisa possível, por meio do apoio financeiro e do incentivo à pesquisa brasileira. E ao PPGCV, por toda a estrutura, carinho e excelência, que proporcionam uma formação com grande diferencial.

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

BIOGRAFIA

CAROLINA MELO DE SOUZA NUNES, natural da cidade de Niterói-RJ, filha de Rosilene Ribeiro de Melo, nascida em 28 de fevereiro de 1996. Concluiu o ensino fundamental e médio no Colégio Pedro II – Unidade São Cristóvão, onde se formou em 2014. Em seguida, em 2015, cursou cinco períodos de Nutrição na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), trancando o curso ao ser aprovada, em 2017, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde iniciou a graduação em Medicina Veterinária. Realizou estágio e iniciação científica no Setor de Anatomia Patológica da UFRRJ por mais de dois anos, participou de diferentes projetos de extensão e realizou estágios nas áreas de oncologia e clínica de pequenos animais, além de produção e clínica de equinos. Em 2023, graduou-se em Medicina Veterinária pela UFRRJ e, imediatamente, ingressou na pós-graduação como mestranda no Programa de Ciências Veterinárias, sob orientação e confiança da professora doutora Bruna de Azevedo Baêta, onde pôde aflorar ainda mais sua paixão pelo universo da pesquisa e da docência. Nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

RESUMO

NUNES, Carolina Melo de Souza. 2025. **Caracterização molecular de *Anaplasma marginale* e variáveis associadas a infecção em bovinos naturalmente infectados do Estado do Rio de Janeiro**. 43p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

A anaplasmoze bovina, causada por *Anaplasma marginale*, é uma hemoparasitose de grande importância econômica e sanitária na pecuária mundial, transmitida principalmente pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*. A doença apresenta grande diversidade genética, refletida principalmente nas proteínas de superfície MSP1a e MSP4, que influenciam tanto a variabilidade antigênica quanto a capacidade de evasão imunológica do patógeno. Este estudo objetivou avaliar a prevalência e a diversidade genética de *A. marginale* em bovinos de propriedades de criação convencionais e orgânicas no estado do Rio de Janeiro. A análise das propriedades buscou analisar se manejo sanitário inadequado e/ou alta densidade de vetores contribuem para a manutenção e disseminação do agente etiológico. Foram coletadas 388 amostras de sangue de bovinos em sete municípios, com posterior extração de DNA, amplificação molecular dos genes GAPDH, *msp4* e *msp1a*, e análise das repetições em tandem de *msp1a*. Os resultados mostraram uma prevalência de 66,8% de *Anaplasma* spp. nas amostras analisadas, com identificação de oito cepas circulantes. Observou-se predominância do genótipo E, com uma variação E1, evidenciando a diversidade genética do patógeno na região. Os resultados destacam a necessidade de adotar estratégias integradas de manejo e controle, envolvendo vigilância epidemiológica contínua e ações eficientes de controle de vetores, para reduzir a prevalência da anaplasmoze e minimizar seus impactos nos rebanhos bovinos.

Palavras-chave: Anaplasmoze; diversidade genética; produção bovina.

ABSTRACT

NUNES, Carolina Melo de Souza. 2025. **Molecular characterization of *Anaplasma marginale* and variables associated with infection in naturally infected cattle from the State of Rio de Janeiro.** 43 p. Dissertation (Master's Degree in Veterinary Sciences), Institute of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Bovine anaplasmosis, caused by *Anaplasma marginale*, is a hemoparasitic disease of major economic and sanitary importance in livestock production worldwide, transmitted mainly by the tick *Rhipicephalus microplus*. The disease exhibits high genetic diversity, primarily reflected in the surface proteins MSP1a and MSP4, which influence both antigenic variability and the pathogen's ability to evade the host immune response. This study aimed to evaluate the prevalence and genetic diversity of *A. marginale* in cattle from conventional and organic farming systems in the state of Rio de Janeiro. The analysis of farms sought to determine whether inadequate sanitary management and/or high vector density contribute to the maintenance and dissemination of the etiological agent. A total of 388 bovine blood samples were collected from seven municipalities, followed by DNA extraction, molecular amplification of the *GAPDH*, *msp4*, and *msp1α* genes, and analysis of tandem repeats in *msp1α*. The results showed a prevalence of 66.8% of *Anaplasma* spp. in the analyzed samples, with the identification of eight circulating strains. A predominance of genotype E was observed, with an E1 variation, highlighting the genetic diversity of the pathogen in the region. These findings emphasize the need to adopt integrated management and control strategies, including continuous epidemiological surveillance and effective vector control measures, to reduce the prevalence of anaplasmosis and minimize its impact on cattle herds.

Keywords: Anaplasmosis; genetic diversity; cattle production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de desenvolvimento de <i>A. marginale</i> em bovinos, carrapatos e outras fontes de infecção. Fonte: https://faculdadegalileu.com.br/Artigo-Anaplasmosse-Bovina.pdf	4
Figura 2. Mapa do estado do Rio de Janeiro, destacando município onde foram realizadas coletas de sangue bovino no presente estudo. Fonte: Adaptado de www.mapasparacolorir.com.br	9
Figura 3. Representação dos produtos da PCR para o gene <i>GAPDH</i> (200pb - seta branca), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®) corado com DSVIEW nucleic stain 20.000X (Sinapse Inc®) e separados por eletroforese (5V/cm), visualizados em transiluminador UV. Poço 1-24: amostras positivas. Poço 25-28: controles negativos. Poço 29: ladder.....	15
Figura 4. Representação dos produtos de PCR para o gene <i>msp4</i> (831 pb), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®) corado com DSVIEW nucleic stain 20.000X (Sinapse Inc®) e separados por eletroforese (5V/cm), visualizados em transiluminador UV. Poço 1: ladder; Poço 2-27: amostras positivas (poços 25 e 27 - controles positivos de <i>Anaplasma platys</i> -like). Poço 28-29: controles negativos; Poço 30: controle positivo para <i>Anaplasma marginale</i>	15
Figura 5. Árvore filogenética baseada em sequências nucleotídicas do gene <i>msp1a</i> de <i>Anaplasma marginale</i> obtidas no presente estudo (destacadas) e sequências de referência recuperadas do GenBank. As sequências foram alinhadas utilizando o MUSCLE no MEGA 11, e a árvore foi reconstruída pelo método de Máxima Verossimilhança sob o modelo de substituição de Kimura de 2 parâmetros. Os valores de bootstrap foram calculados com 1000 replicações, e apenas valores acima de 60% são mostrados nos nós. Para cada sequência, o perfil correspondente de repetições em tandem é indicado, sendo que os padrões identificados no presente estudo correspondem aos resumidos na Tabela 3.	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Representação da avaliação do manejo, densidade de vetores e tipo de produção de cada propriedade de criação bovina do estado do Rio de Janeiro, utilizada no presente estudo.	14
Tabela 2. Distribuição de amostras por município, número de positivos e percentual para <i>Anaplasma</i> spp. e sistemas de produção no estado do Rio de Janeiro.....	16
Tabela 3. Estrutura de repetições em tandem de <i>msp1α</i> , genótipo, m, n e distância SD-ATG dos isolados de <i>Anaplasma marginale</i> no estado do Rio de Janeiro.	17
Tabela 4. Índices de diversidade genética e estatísticas dos testes de neutralidade dos genes <i>msp1a</i> de <i>Anaplasma marginale</i> : comparação entre isolados do presente estudo, de outras regiões do Brasil, das Américas e em nível global.	19
Tabela 5. Diferenciação genética pareada (teste de significância χ^2 , Fst e Dxy) entre grupos de sequências <i>msp1a</i> de <i>Anaplasma marginale</i> : comparação dos isolados do presente estudo com aqueles do Brasil, das Américas e de conjuntos globais de dados.	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Criação de Gado no Brasil	2
2.1.1. Pecuária orgânica	3
2.2. Família Anaplasmataceae	3
2.2.1. <i>Anaplasma marginale</i>	3
2.2.1.1 Taxonomia e morfologia	3
2.2.1.2 Ciclo Biológico	4
2.2.1.3. Anaplasmosse bovina	5
2.2.1.4. Epidemiologia	6
2.2.1.5. Diagnóstico	6
2.2.1.6. Diversidade genética de <i>Anaplasma marginale</i>	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Aspectos éticos e legais da pesquisa científica	9
3.2 Coleta das amostras	9
3.3 Avaliação das propriedades	10
3.4. Extração de DNA do sangue	10
3.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	10
3.5.1 Análise molecular para avaliar viabilidade das amostras extraídas	10
3.5.2. Análise molecular para o gene <i>msp4</i> de <i>Anaplasma spp.</i>	10
3.5.3. Análise molecular para variabilidade genética de <i>Anaplasma marginale</i> com o gene <i>msp1a</i>	11
3.6. Eletroforese	11
3.7. Análise Filogenética	11
3.8. Identificação e caracterização das repetições em tandem do gene <i>msp1a</i>	12
3.9. Variabilidade genética e diferenciação interpopulacional de sequências do gene <i>msp1a</i> de <i>Anaplasma marginale</i>	12
3.10 Análise estatística do manejo sanitário	13
4. RESULTADOS	14
4. DISCUSSÃO	21
CONCLUSÕES	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ANEXO I	31

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos pilares do setor agropecuário brasileiro, destacando-se tanto na produção de carne quanto de leite, com relevância econômica expressiva para o país (IBGE, 2023; 2025). Apesar do crescimento e da diversificação dos sistemas de produção, que vão desde o extensivo, predominante em grandes áreas de pastagem, até modelos semi-intensivos e intensivos, a atividade ainda enfrenta desafios relacionados à saúde animal e à sustentabilidade produtiva (Gomes *et al.*, 2025; Bizi, 2018; Khalil, 2020). Entre as principais limitações, as hemoparasitoses se destacam por impactarem a produtividade, o bem-estar e a rentabilidade dos rebanhos.

A anaplasmose bovina, causada por *Anaplasma marginale*, é uma doença de grande relevância sanitária e econômica na pecuária brasileira, integrando o complexo da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) juntamente com *Babesia bovis* e *B. bigemina*. Caracteriza-se por anemia, febre, perda de peso e mortalidade em casos agudos (Kuttler, 1984; Puentes; Riete-Correa, 2023). Transmitida principalmente pelo carrapato *Rhipicephalus microplus*, a enfermidade ocorre em diferentes padrões endêmicos, representando risco e perdas econômicas constantes para rebanhos em todo o país (Araújo *et al.*, 2003). O controle da doença é dificultado pela ampla distribuição geográfica do agente, pelas diferentes formas de transmissão, pela alta diversidade genética das cepas e pela ocorrência frequente de infecções subclínicas, que contribuem para a manutenção silenciosa do patógeno nos rebanhos (Kocan *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2015).

O manejo adotado nas propriedades, também é um fator determinante para a circulação de hemoparasitos. Práticas sanitárias inadequadas, alta densidade de vetores e ausência de acompanhamento veterinário contribuem para a propagação de *A. marginale*, enquanto propriedades com manejo satisfatório, nutrição adequada e controle de vetores tendem a apresentar menor prevalência da doença (NCAT, 2015; Andrade Junior, 2021; Mor *et al.*, 2024). Além disso, sistemas orgânicos, apesar de seguirem normas de produção sustentável e bem-estar animal, ainda carecem de informações robustas sobre a ocorrência de hemoparasitoses, evidenciando uma lacuna na literatura nacional e internacional (Pajoro *et al.*, 2024; Weber; Silva, 2021).

A diversidade genética de *A. marginale*, especialmente em genes de superfície como *msp1a* e *msp4*, desempenha papel crucial tanto na adaptação do patógeno quanto na evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Enquanto o gene *msp4* é altamente conservado e confiável para detecção diagnóstica, o *msp1a* apresenta regiões hipervariáveis compostas por repetições em tandem, sendo um marcador importante para estudos de variabilidade genética e diferenciação de isolados (Allred *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 2015). Essa variabilidade influencia diretamente a epidemiologia da doença, incluindo padrões de transmissão transplacentária, susceptibilidade por idade e raça, bem como a resposta a estratégias de controle.

Diante desse cenário, estudos que integrem diagnóstico molecular, análise de diversidade genética e avaliação do manejo das propriedades são fundamentais para compreender a dinâmica da infecção por *A. marginale* e subsidiar estratégias de controle mais eficazes. O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência e a diversidade genética de *Anaplasma marginale* em bovinos naturalmente infectados do estado do Rio de Janeiro, além de verificar a possibilidade de propriedades com manejo precário e alta densidade de vetores apresentarem maior prevalência e diversidade genética de *A. marginale*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Criação de Gado no Brasil

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com cerca de 238 milhões de cabeças em 2023, distribuídas em aproximadamente 2,5 milhões de propriedades (IBGE, 2023). Em 2024, foram abatidos cerca de 39,3 milhões de bovinos, e exportadas cerca de 2,55 milhões de toneladas de carne, gerando receitas anuais superiores a US \$ 8 bilhões (IBGE, 2025). Ainda neste ano, foi registrado o segundo recorde na produção de leite no Brasil, 25,38 bilhões de litros, ficando atrás apenas do ano de 2020 onde foram registrados 25,64 bilhões de litros de leite (IBGE, 2025). Esses dados reforçam a importância da criação de gado na economia do país.

A introdução do gado no território brasileiro ocorreu ainda nos primeiros momentos da colonização portuguesa, como parte das estratégias de ocupação e exploração econômica da colônia. Em função da ampla extensão territorial e da baixa densidade populacional, a pecuária desenvolveu-se majoritariamente sob o sistema extensivo. Embora inicialmente voltada ao abastecimento das necessidades alimentares e logísticas do mercado interno, a atividade pecuária rapidamente passou a integrar o circuito exportador colonial. Produtos como carne seca e couro figuraram entre os primeiros itens derivados da pecuária a serem comercializados com o exterior, desempenhando papel relevante na economia colonial e contribuindo para a consolidação da pecuária como um dos pilares do setor agropecuário brasileiro (Luna; Klein, 2023).

O sistema extensivo de criação de bovinos, predominante no Brasil, caracteriza-se pelo uso de grandes áreas de pastagens naturais ou cultivadas, com mínima intervenção humana e baixo investimento em infraestrutura. Representando cerca de 80% da produção de gado de corte no país, esse modelo é favorecido pelo menor custo de produção, principalmente devido à alimentação baseada em pasto. Entre suas vantagens estão o baixo custo operacional e a possibilidade de criação em larga escala sem necessidade de mão de obra especializada. Entretanto, o sistema apresenta certos desafios, como a limitada eficiência produtiva por unidade de área e a elevada vulnerabilidade às variações climáticas, fatores que influenciam de forma significativa tanto a disponibilidade quanto a qualidade das forragens ao longo das diferentes estações do ano (Gomes *et al.*, 2025).

O sistema semi-intensivo é uma alternativa entre os modelos extensivo e intensivo, combinando manejo em pasto com práticas mais tecnificadas, como a divisão em piquetes e o uso do pastejo rotacionado, o que melhora o aproveitamento da forragem e a recuperação das pastagens. Também é comum a suplementação mineral e, em alguns casos, proteica e energética, especialmente na seca. Esse modelo proporciona maior ganho de peso, aumento da produtividade por área e maior rentabilidade, embora exija investimentos em infraestrutura e mão de obra mais qualificada (Bizi, 2018).

O sistema intensivo, ou confinamento, consiste na criação de bovinos em espaços limitados, onde recebem uma dieta equilibrada composta por forragens armazenadas, concentrados e suplementos, com o objetivo de acelerar o ganho de peso em um curto período. Para que esse sistema funcione bem, é necessário contar com instalações adequadas e um manejo que garanta o conforto e a saúde dos animais, além de utilizar tecnologias que ajudem a melhorar a eficiência da produção. Entre as vantagens desse método estão a alta produtividade, a redução do tempo de produção e a obtenção de carne com padrão uniforme. Por outro lado, esse modelo apresenta custos significativos e requer cuidados contínuos para prevenir situações de estresse e enfermidades relacionadas ao ambiente de confinamento (Khalil. 2020; Gomes *et al.*, 2025).

2.1.1. Pecuária orgânica

A pecuária orgânica no Brasil faz parte de um modelo de agricultura mais sustentável, pautado pelo respeito ao bem-estar animal, à conservação ambiental e à produção de alimentos sem o uso de insumos sintéticos. Essa modalidade tem avançado no país, embora ainda enfrente limitações estruturais, como a baixa assistência técnica e a insuficiência de políticas públicas integradas (Weber; Silva, 2021). Dados do Censo Agropecuário de 2017 revelam que a participação da pecuária orgânica na produção nacional ainda é pequena, concentrando-se em propriedades de pequeno e médio porte, que enfrentam desafios relacionados à certificação e à inserção em mercados consumidores (Ramos, 2022).

Do ponto de vista técnico, a adoção de práticas diferenciadas é fundamental para o funcionamento da pecuária orgânica, especialmente no que diz respeito ao manejo animal e ao controle sanitário. Estratégias como o uso de plantas medicinais, o controle biológico e outras práticas agroecológicas têm se mostrado eficazes no controle de parasitas como os carrapatos, oferecendo alternativas viáveis aos produtos convencionais (Lima *et al.*, 2024). Para orientar essas práticas, a Portaria MAPA nº 52/2021 estabelece normas específicas para a produção orgânica de ruminantes, com foco no bem-estar animal, no uso sustentável dos recursos naturais e na rastreabilidade dos processos produtivos (Escosteguy; Jantzen, 2024).

Apesar dos avanços normativos, a implementação de políticas públicas voltadas ao incentivo da pecuária orgânica ainda é marcada por descontinuidade e falta de articulação entre os entes federativos, o que limita o crescimento do setor (Hybner; Alves, 2024). A construção de sistemas mais sustentáveis, portanto, exige ações integradas entre produtores, técnicos, pesquisadores e instituições, fortalecendo o modelo orgânico como um processo coletivo e contínuo (Mouro; Diniz; Paiva, 2021). Assim, embora a pecuária orgânica no Brasil apresente grande potencial, sua consolidação como alternativa viável e sustentável à pecuária convencional depende de avanços institucionais e estruturais consistentes.

2.2. Família Anaplasmataceae

A família Anaplasmataceae é considerada o maior grupo de bactérias intracelulares obrigatórias transmitida por vetores como artrópodes, principalmente carrapatos, mas já foram identificadas em mosquitos, pulgas, piolhos e ácaros (Huang *et al.*, 2025). Os gêneros pertencentes a essa família infectam mamíferos e aves, com exceção do gênero *Wolbachia* que ocorrem em insetos, ácaros, aranhas, nematóides e em tipos diferentes de artrópodes (Hoffmann *et al.*, 2020). Essas bactérias se desenvolvem dentro de vacúolos no citoplasma da célula hospedeira e infectam variados e específicos tipos de células como plaquetas, monócitos, macrófagos, neutrófilos, eritrócitos e células endoteliais (Pruneau *et al.*, 2014).

A primeira descrição da espécie Anaplasmataceae foi feita em 1910 na África do Sul, onde *Anaplasma marginale* foi identificado como um agente causador de doença em bovinos transmitida por carrapatos e pela inoculação no sangue (Theiler, 1910).

O estudo de Dumler *et al.* (2001) foi fundamental, ao propor uma nova classificação da família Anaplasmataceae baseada em características genéticas, especialmente diferenças em genes como o do RNA ribossomal 16S, genes codificadores de proteínas estruturais e funcionais e operons como o *groESL*. Também foram considerados dados como patogenicidade, especificidade pelo hospedeiro, modo de transmissão, local de parasitismo e períodos pré-patente e patente. Com base nesses critérios, os autores reorganizaram diversos gêneros e espécies, levando à inclusão de *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Wolbachia* na família Anaplasmataceae, além de manter os gêneros *Anaplasma* e *Aegyptianella*.

2.2.1. *Anaplasma marginale*

2.2.1.1 Taxonomia e morfologia

Quanto à classificação taxonômica mais recente de *Anaplasma marginale* tem-se como

Reino: Bacteria (Cavalier-Smith, 2002), Sub Reino: Negibacteria (Cavalier-Smith, 2002), Filo: Proteobacteria (Garrity *et al.*, 2005), Classe: Alphaproteobacteria (Garrity; Bell; Timothy, 2005), Ordem: Rickettsiales (Gieszczykiewicz, 1939), Família: Anaplasmataceae (Philip, 1957), Gênero: *Anaplasma* (Theiler, 1910) e Espécie: *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910).

Em 1896, Salmon e Smith relataram, pela primeira vez, a presença de estruturas muito pequenas, de coloração azulada, localizadas na periferia dos eritrócitos em esfregaços de sangue bovino. Posteriormente, em 1910, Arnold Theiler também descreveu a ocorrência de estruturas periféricas nos eritrócitos de bovinos na África do Sul, associando-as a uma enfermidade que denominou como "mal da bile".

Anaplasma marginale são bactérias intracelulares obrigatórias, gram-negativas, de tamanho pequeno e morfologia pleomórfica, que variam de cocóides a elipsóides. Sua replicação ocorre dentro de vacúolos citoplasmáticos, geralmente nos eritrócitos dos hospedeiros. No interior das células podem estar isolados ou organizados em estruturas compactas denominadas mórulas (Dumler *et al.*, 2001).

2.2.1.2 Ciclo Biológico

O ciclo de vida de *A. marginale* é estreitamente associado ao ciclo alimentar de seus vetores biológicos, os carrapatos. Logo após a ingestão de hemácias infectadas, as bactérias invadem as células intestinais do carrapato, onde iniciam seu desenvolvimento. Essa replicação deve ocorrer sem que o vetor seja prejudicado. A partir daí, migram para outros tecidos, especialmente para as glândulas salivares. Nessas glândulas, *A. marginale* forma colônias que se multiplicam por divisão binária, originando grandes aglomerados com centenas de organismos. Inicialmente, as bactérias presentes nas colônias assumem a forma de corpúsculos reticulados, considerados a fase vegetativa e replicativa. Posteriormente, essas estruturas se transformam em corpúsculos densos, a forma infectante da bactéria, capaz de sobreviver temporariamente fora das células do hospedeiro. A transmissão para os bovinos ocorre quando os corpúsculos densos são inoculados durante a alimentação do carrapato, por meio da secreção das glândulas salivares (Magunda *et al.*, 2016; Kocan *et al.*, 2010; Kocan *et al.*, 2002) (Fig.1).

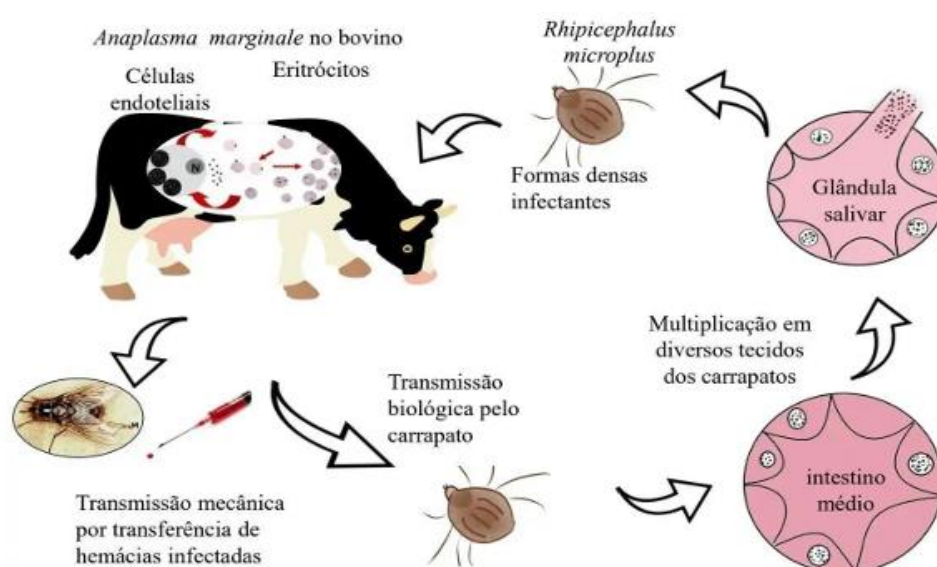


Figura 1. Ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* em bovinos, carrapatos e outras fontes de infecção. Fonte: <https://faculadegalileu.com.br/Artigo-Anaplasnose-Bovina.pdf>

Até o momento, aproximadamente 20 espécies de carrapatos já foram identificadas como vetores na transmissão da anaplasmose em diferentes regiões do mundo (Kocan *et al.*, 2010). Entre esses, destaca-se o *Rhipicephalus microplus*, amplamente reconhecido como um dos principais vetores biológicos da anaplasmose bovina (Martins *et al.*, 2020; Mazzucco *et al.*, 2023; Connell & Hall, 1972). A transmissão pode ter ocorrência transestadial, entre diferentes fases de desenvolvimento do carrapato, ou intraestadial, ou seja, dentro da mesma fase de desenvolvimento do vetor (Connell, 1974; Ravindran *et al.*, 2023). Com relação a transmissão transovariana, a maioria dos trabalhos encontrados relata que não ocorre (Leatch, 1973; Esteves *et al.*, 2015; Panizza *et al.*, 2022), porém um estudo recente demonstrou transmissão transovariana de *A. marginale* em *R. microplus* em condições naturais e que larvas infectadas são capazes de transmitir a bactéria a bovinos suscetíveis em ensaios experimentais (De La Fourniere *et al.*, 2023), sugerindo a necessidade de mais pesquisas para uma melhor compreensão sobre os aspectos dessa transmissão.

A transmissão de *A. marginale* pode ocorrer por vias não convencionais, como a transmissão mecânica e transplacentária, sendo ambos relevantes em sistemas de criação bovina onde o controle de vetores biológicos é menos eficiente ou ausente, o que favorece a maior circulação desse patógeno no rebanho. A transmissão mecânica ocorre principalmente por instrumentos contaminados, como agulhas reutilizadas, castradores, marcadores e outros materiais que entram em contato com sangue infectado, bem como por moscas hematófagas do gênero *Tabanus* e *Stomoxys* (Kocan *et al.*, 2010; Zabel; Agosto, 2018). Em um rebanho livre de carrapatos no México, Bautista *et al.* (2018) detectaram a presença do patógeno em moscas coletadas próximas aos animais, indicando que *S. calcitrans* pode atuar como vetor alternativo em áreas sem infestação por carrapatos. Araújo *et al.* (2021) relataram pela primeira vez no Brasil a presença de *A. marginale* em diferentes tecidos de moscas de campo e de colônia F1, sugerindo que o inseto é capaz de portar o patógeno e potencialmente contribuir para a sua circulação no rebanho, embora a transmissão efetiva ao gado ainda não tenha sido comprovada. Entretanto, um estudo recente investigou a transmissão mecânica de *A. marginale* por *Stomoxys calcitrans* concluiu que esse vetor não foi capaz de realizar a transmissão da bactéria ao gado mesmo tendo sido constatada a sua presença no abdômen da mosca e mesmo sob condições extremamente favoráveis, melhores que as condições normalmente encontradas à campo (Heller *et al.*, 2025).

Já a transmissão transplacentária, embora considerada rara, tem sido confirmada em diversos estudos experimentais e de campo, com taxas variando entre 5 % e 15 %, sendo capaz de gerar bezerros infectados assintomáticos que atuam como fontes silenciosas de infecção no rebanho (Grau *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2016). Esses mecanismos contribuem para a persistência da anaplasmose em áreas livres de carrapatos ou sob controle rigoroso, ressaltando a necessidade de boas práticas de manejo e controle sanitário.

2.2.1.3. Anaplasmose bovina

Anaplasma marginale, agente etiológico da anaplasmose bovina, integra o complexo de doenças conhecido como tristeza parasitária bovina (TPB), juntamente com os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*. Essa enfermidade é caracterizada por anemia, perda de peso, febre, aborto e morte em casos agudos, representando uma das maiores causas de prejuízos sanitários e econômicos na bovinocultura brasileira (Kuttler, 1984; Puentes; Riete-Correa, 2023).

Transmitida principalmente pelo carrapato *R. microplus*, a anaplasmose ocorre tanto em áreas de instabilidade endêmica, nas quais são observadas altas taxas de mortalidade, quanto em áreas de estabilidade endêmica, onde, apesar da ausência de surtos, há risco de infecção em

animais introduzidos provenientes de regiões livres de carrapato ou sob controle intensivo desse vetor (Araújo *et al.*, 2003).

No contexto nacional, estima-se que as parasitoses bovinas gerem perdas superiores a US\$ 13 bilhões por ano, sendo o carrapato, vetor essencial da TPB, responsável por aproximadamente US\$ 3,24 bilhões em prejuízos anuais, somando danos diretos e indiretos à produção (GRISI *et al.*, 2014).

2.2.1.4. Epidemiologia

Anaplasma marginale é considerado o agente transmitido por carrapatos de maior ocorrência global, estando presente em todos os seis continentes, onde causa elevados índices de morbidade e mortalidade em bovinos nas regiões de clima temperado, subtropical e tropical (Kocan *et al.*, 2010). Sua ampla distribuição reflete sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes, abrangendo continentes como América, Europa, África, Ásia e Austrália. Nos Estados Unidos, a doença apresenta caráter enzoótico em diversas regiões, destacando-se os estados do Atlântico Sul, da Costa do Golfo e parte do meio-oeste e oeste, evidenciando a relevância epidemiológica do patógeno em distintos contextos geográficos (Guglielmone, 1995).

Em regiões tropicais, onde a prevalência de *A. marginale* é elevada, observa-se maior ocorrência de superinfecções quando comparadas a áreas temperadas. Esse padrão está relacionado à diversidade genética do patógeno e pode ser influenciado pela diferença nos vetores predominantes, como *R. microplus* nos trópicos e *Dermacentor andersoni* em zonas temperadas. Nessas condições, animais infectados podem abrigar múltiplas cepas geneticamente distintas, evidenciando a complexidade epidemiológica da anaplasmosse bovina (Castaneda-Ortiz *et al.*, 2015).

A dinâmica epidemiológica da anaplasmosse bovina está diretamente relacionada à presença do carrapato *R. microplus* e às condições climáticas que influenciam seu ciclo. Em áreas livres, o vetor não consegue se estabelecer, enquanto nas regiões de instabilidade enzoótica há períodos em que seu desenvolvimento é interrompido, retardando o contato dos animais jovens com o agente e favorecendo manifestações graves na fase adulta. Por outro lado, em áreas de estabilidade, mais de 75% dos bovinos são expostos até os nove meses de idade, o que garante imunidade precoce e reduz a ocorrência de surtos. Um fator agravante ocorre quando bovinos do semiárido, onde o carrapato não sobrevive, são comercializados durante a estiagem para regiões úmidas e favoráveis à multiplicação do vetor, propiciando a introdução e disseminação da anaplasmosse em novos rebanhos (Santos *et al.*, 2017; Sott *et al.*, 2016; Gonçalves, 2000).

A susceptibilidade dos bovinos à anaplasmosse varia de acordo com a idade e a raça. Embora todas as raças sejam vulneráveis à infecção por *A. marginale*, observa-se que animais *Bos indicus* tendem a manifestar sintomas mais brandos em comparação aos *Bos taurus*. Além disso, os bezerros apresentam maior resistência ao desenvolvimento da forma clínica da doença, enquanto bovinos com idade superior a dois anos estão mais propensos a apresentar quadros leves ou graves, que incluem febre persistente, letargia, icterícia, perda de peso, aborto, queda na produção de leite e, em casos sem tratamento, elevada taxa de mortalidade (Muñoz-Guarniz *et al.*, 2017). Estudos experimentais realizados em bezerros esplenectomizados comprovam que quando há ausência do baço, os bezerros tornam-se altamente vulneráveis à infecção por *A. marginale*, resultando em quadros clínicos mais intensos do que aqueles geralmente observados em animais adultos (Kocan *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2019; Kuttler, 1967), porém, essa dinâmica permanece pouco compreendida (Ierardi, 2025).

2.2.1.5. Diagnóstico

Dentre os métodos diagnósticos utilizados, destacam-se as técnicas parasitológicas e

sorológicas. Os métodos sorológicos, como o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), têm sido amplamente aplicados pela sua praticidade e pela possibilidade de aplicação em estudos epidemiológicos, embora apresentem limitações quanto à sensibilidade e especificidade em estágios iniciais da infecção. A escolha do antígeno utilizado no ELISA influencia diretamente na sensibilidade do teste, sendo os antígenos recombinantes uma boa alternativa (Ramos *et al.*, 2010).

A técnica de ELISA indireto (ELISAI) também foi utilizada por Medina-Naranjo *et al.* (2017) em um estudo conduzido em três fazendas da província de Pastaza, Equador, onde demonstrou utilidade para triagem de infecções por *A. marginale* em bovinos, juntamente com outros hemoparasitos como *Trypanosoma* spp. e *Babesia* spp. O estudo demonstrou a ocorrência simultânea de múltiplos agentes, ressaltando a importância do diagnóstico diferencial.

Já as técnicas parasitológicas, destacam-se a busca direta do agente etiológico nas hemácias dos animais parasitados a partir de esfregaços sanguíneos e as técnicas moleculares. No que diz respeito à identificação direta do agente por meio da visualização de corpúsculos marginais nos eritrócitos em esfregaços sanguíneos corados permanece como método de referência em muitas regiões, embora sua sensibilidade seja limitada, especialmente em infecções crônicas ou com baixa parasitemia (Vidotto; Marana, 2001). Esse método também foi adotado em estudos retrospectivos como o de Silva *et al.* (2022), que analisaram dados da TPB na Bahia entre 2017 e 2021, destacando sua aplicação em contextos de vigilância epidemiológica.

As técnicas moleculares, por sua vez, têm se destacado pela elevada sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção direta do DNA do patógeno, mesmo em portadores assintomáticos ou em fases iniciais da infecção. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é amplamente utilizada para esse fim, sendo recomendada tanto para diagnóstico clínico quanto para estudos epidemiológicos (Silaghi *et al.*, 2017). A PCR demonstrou alta eficiência na detecção de *A. marginale* em bovinos e búfalos naturalmente infectados no estado do Amapá, demonstrando seu potencial de aplicação prática em condições reais de criação animal, fora do ambiente controlado de pesquisa (Moura, 2023).

Recentemente, a técnica de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP – *Loop-mediated Isothermal Amplification*) tem sido considerada uma alternativa promissora à PCR convencional, principalmente por sua simplicidade operacional e menor necessidade de infraestrutura laboratorial. Essa técnica tem se mostrado viável para o diagnóstico molecular da infecção natural por *A. marginale*, podendo representar uma opção acessível para regiões com menor suporte técnico (Moura *et al.*, 2025).

2.2.1.6. Diversidade genética de *Anaplasma marginale*

A complexidade no controle de *A. marginale* em bovinos é amplamente atribuída à notável diversidade antigênica e genética do patógeno, que se manifesta em cepas variadas entre regiões geográficas, dentro de um mesmo rebanho e até mesmo em um único animal infectado (Vega *et al.*, 2007). Compreender a extensão e os mecanismos dessa variabilidade genética é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes, incluindo o aprimoramento de métodos diagnósticos e o desenvolvimento de vacinas mais abrangentes (Quiroz-Castañeda; Amaro-Estrada; Rodríguez-Camarillo, 2016).

As Proteínas de Superfície Principais (MSPs) de *A. marginale* desempenham um papel crucial na interação do patógeno com o hospedeiro bovino e os vetores carrapatos, sendo também os principais alvos da resposta imune. Seis MSPs foram identificadas em *A. marginale* derivadas de eritrócitos bovinos, e sua conservação em organismos derivados de carrapatos e culturas de células sugere sua importância funcional. Proteínas de superfície de *A. marginale*, como MSP1b, MSP2 e MSP3, pertencem a famílias multigênicas e apresentam variação

antigênica, característica observada principalmente em bovinos cronicamente infectados. Em contraste, MSP1a, MSP4 e MSP5 são codificadas por genes únicos e mantêm-se estáveis entre diferentes isolados (Tebele; McGuire; Palmer, 1991; Cabezas-Cruz *et al.*, 2013).

A porção N-terminal da MSP1 apresenta elevada variabilidade estrutural, caracterizada por repetições (“repeats”) formadas por peptídeos de 23 a 31 aminoácidos com alta similaridade entre si (De la Fuente *et al.*, 2005). Em contrapartida, sua região C-terminal é bastante conservada. Essa proteína constitui um heterodímero formado por dois polipeptídeos distintos, MSP1a e MSP1b, sendo que a subunidade MSP1a é codificada por uma única cópia do gene *msp1a* (Allred *et al.*, 1990).

O estudo das repetições em tandem do gene *msp1a* constitui uma abordagem relevante para ampliar o conhecimento sobre a diversidade genética global de *A. marginale*. Em locais não endêmicos, tais repetições apresentam baixa variação. Por outro lado, em regiões endêmicas, verifica-se maior heterogeneidade nas sequências de *msp1a*, e alguns animais podem abrigar simultaneamente diferentes variantes dessas repetições (Silva *et al.*, 2015). Estudos filogenéticos demonstram, entretanto, que o *msp1a* evolui rapidamente, o que limita seu uso para definir linhagens geográficas, mas ressalta sua relevância na compreensão da variabilidade genética de *A. marginale* em diferentes regiões endêmicas (De la Fuente *et al.*, 2005).

Diversas cepas de *A. marginale* descritas em diferentes países têm sido associadas a surtos de anaplasmoze, incluindo as variantes α - β^3 - Γ e τ -10 15 observadas no México e na Argentina, e a cepa α - β^3 - Γ vinculada a quadros agudos com mortalidade em bovinos leiteiros no Brasil (Ruybal *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2015).

Uma pesquisa realizada na Rússia relatou pela primeira vez a diversidade genética de *A. marginale* em bovinos, revelando alta variabilidade no gene *msp1a*. Foram identificados 16 novos genótipos, incluindo repetições em tandem inéditas e diferentes microssatélites, com parte dos animais apresentando coinfeção por múltiplos genótipos. A análise filogenética mostrou que os isolados se distribuíram em clados distintos, evidenciando a ampla diversidade do patógeno no país (Fedorina *et al.*, 2019).

Estudos realizados em bezerros de propriedades leiteiras do noroeste de Minas Gerais revelaram elevada diversidade genética de *A. marginale*, incluindo a descrição de dez novas cepas, com predomínio do genótipo E. Entre as variantes identificadas, a cepa α - β -F-F-F esteve associada a casos clínicos agudos, sugerindo maior potencial patogênico dessa linhagem em bezerros da região (Bahia *et al.*, 2021). Estudos realizados com culturas de células IDE8 de *Ixodes scapularis* permitiram o isolamento de dois novos isolados, AmRio1 e AmRio2, ambos classificados no genótipo E, mas geneticamente distintos. Uma das cepas apresentou repetição em tandem inédita, denominada 162. Tais resultados reforçam o papel do gene *msp1a* como marcador genético estável, ao mesmo tempo em que evidenciam seu potencial para subsidiar estratégias de controle da anaplasmoze, seja no desenvolvimento de vacinas e diagnósticos, seja na compreensão da transmissibilidade por carrapatos (Baêta *et al.*, 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos e legais da pesquisa científica

As amostras coletadas e utilizadas nesse trabalho foram aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sob o número de protocolo 1051220524 (Anexo1).

3.2 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de sangue de bovinos distribuídas nos municípios de Guapimirim, Miguel Pereira, Piraí, Seropédica, Teresópolis, Vassouras e Volta Redonda, estado do Rio de Janeiro (Fig2). As propriedades foram selecionadas com base no interesse dos produtores em participar do projeto (amostragem por conveniência).

O cálculo do tamanho mínimo da amostra foi realizado de acordo com a prevalência esperada (Medronho, 2009), sendo obtido através da fórmula de amostragem simples, em que uma prevalência esperada de 50% é considerada da seguinte forma:

$$n = \frac{[z(\alpha/2)]^2 \pi (1 - \pi)}{\varepsilon^2}$$

Onde: n é o número amostral; $z(\alpha/2)$ é o valor z de nível α (para intervalo de confiança de 95%: 1,96); π é a prevalência esperada (0,50); e ε é o erro esperado (0,05).

Os animais foram contidos individualmente em troncos de contenção para realização dos procedimentos. Antes da coleta, foi realizada a antisepsia da região com algodão embebido em álcool 70% e coletado da veia coccígea através do sistema vacutainer, 3 mL de sangue, sendo acondicionado em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Os materiais foram refrigerados imediatamente em caixas isotérmicas até a chegada ao Laboratório de Estudo da Interação Parasito-Hospedeiro (LEIPH) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). No laboratório, as amostras foram armazenadas em freezer com temperatura de -20 graus celsius.

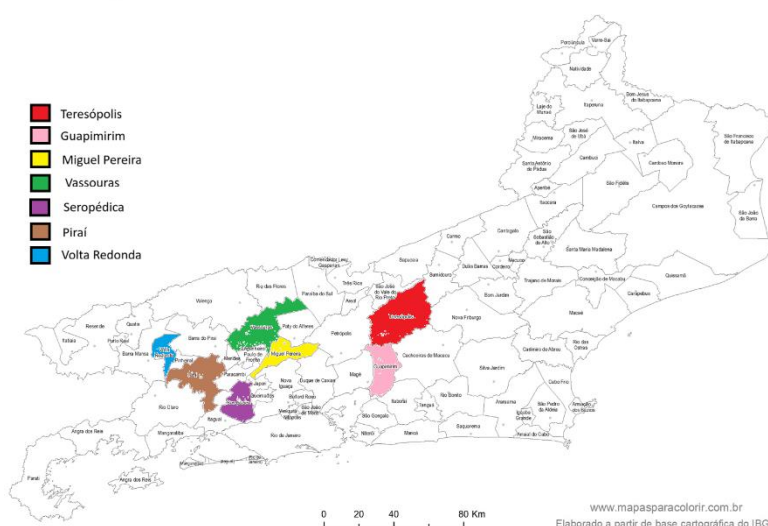


Figura 2. Mapa do estado do Rio de Janeiro, destacando os municípios onde foram realizadas coletas de sangue bovino no presente estudo. Fonte: Adaptado de www.mapasparacolorir.com.br

3.3 Avaliação das propriedades

Foi realizada uma avaliação baseada na observação de características das propriedades onde foram realizadas as coletas. Para definir se o manejo da propriedade seria considerado satisfatório, regular ou precário utilizou-se como critério o manejo sanitário levando em consideração a presença ou ausência de dejetos e a limpeza das instalações dos animais, equipamentos de proteção dos tratadores, utilização de luvas no manejo, assepsia das mãos, botas e objetos e a observação do estado nutricional e de cuidado dos animais. Como critério para densidade de vetores a classificação em cruzes foi feita de acordo com presença alta, baixa ou ausente. A propriedade foi considerada de manejo satisfatório quando cumpriu todas as exigências dessa avaliação e foi considerada padrão, o que significa que todos os critérios de manejo sanitário, nutrição e cuidado dos animais estavam corretos. Foram classificadas como propriedades de manejo precário aquelas que apresentavam todas as características de falta de higiene e animais mal nutridos e mal cuidados. Propriedades de manejo regular apresentavam como características falta de higiene ou animais mal nutridos e/ou mal cuidados, sendo necessário um aspecto estar de acordo com o considerado satisfatório.

3.4. Extração de DNA do sangue

A realização de extração de DNA das amostras foi realizada através da metodologia descrita por Sambrook (1989) utilizando Fenol-clorofórmio. Após finalizadas as extrações, todas as amostras foram armazenadas em tubos de polipropileno de 1,5 mL em freezer a -20°C para as análises moleculares.

3.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.5.1 Análise molecular para avaliar viabilidade das amostras extraídas

Realizou-se uma PCR convencional com objetivo de amplificar um fragmento de 400 pares de base (pb) do gene endógeno de mamíferos *GAPDH*, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, para avaliar a viabilidade das amostras extraídas. A PCR foi conduzida em microtubos de 200 µl com um produto de 25 µl de volume final, sendo composto por 2 µl do DNA extraído de cada amostra e 23 µl do master mix. Para o preparo do mix foram utilizados: Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 0,8 µM de cada um dos oligoiniciadores *GAPDH-F* (5'CCTTCATTGACCTCAACTACAT 3') e *GAPDH-R* (5'CCAAAGTTGTCATGGATGACC3') (Birkenheuer; Levy; Breitschwerdt, 2003), 0,2 mM de dNTPa, 1,5mM de MgCl₂ (Promega® MgCl₂ Solution), tampão 1X (Colorless GoTaq®, Promega®).

Para realizar a amplificação utilizou-se termociclador T100 (Bio-Rad Laboratórios do Brasil) onde foi inserido o protocolo de termociclagem a seguir: desnaturação inicial a 95° por 2:30 minutos , 35 ciclos de 95° por 30 segundos, 55° por 30 segundos, 72° por 25 segundos e extensão final a 72° por 5 minutos.

3.5.2. Análise molecular para o gene *msp4* de *Anaplasma spp.*

Realizou-se PCR convencional para detecção de agentes do gênero *Anaplasma spp.* com objetivo de amplificar um fragmento de 831 pares de base utilizando os primers EF (5'-TTGTTTACAGGGGGCCTGTC- 3') e ER (5'-GAACAGGAATCTTGCTCCAAG-3') como demonstrado por Mahmmoud e colaboradores (2021). A PCR convencional foi conduzida em microtubos de 200 µl com um produto de 25 µl de volume final, sendo composto por 3 µl de DNA extraído de cada amostra de sangue dos bovinos e 22 µl do mix. Para o preparo do mastermix foram utilizados: Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 0,4µM de cada iniciador, 0,2 mM de dNTP, 1,5mM de MgCl₂ (Promega® MgCl₂ Solution), tampão 1X (Colorless GoTaq®, Promega®).

O protocolo instituído no termociclador foi: 95° por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 95° por 30 segundos, 55° por 30 segundos, 72° por 45 segundos e uma extensão final de 72° por 5 minutos. Como controles positivos foram utilizadas amostras previamente analisadas e sequenciadas para *A. marginale*. Como controles negativos utilizaram-se água ultrapura livre de DNases dentro e fora do fluxo.

3.5.3. Análise molecular para variabilidade genética de *Anaplasma marginale* com o gene *msp1a*

Foram selecionadas ao menos uma amostra positiva na PCR de *msp4* de cada propriedade, aleatoriamente, para serem analisadas quanto a variabilidade genética com o gene *msp1a*. Realizou-se uma adaptação da PCR semi-nested instituída por Lew *et al.* (2002) para uma PCR convencional utilizando apenas o segundo ciclo de amplificação. Os primers utilizados foram o 1733F (5' TGTGCTTATGGCAGACATTTC 3') e o 2957R (5' AAACCTTGTAGCCCCAACTTATCC 3'). A reação foi conduzida em microtubos de 200 µl com um produto de 25 µl de volume final, sendo 2,5 µl de DNA e 22,5 µl do mix. Para o preparo do mix foram utilizados: Taq polimerase a 1U (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), 0,4µM de cada primer, 0,2 mM de dNTP, 2 mM de MgCl₂ (Promega® MgCl₂ Solution), tampão 1X (Colorless GoTaq®, Promega®).

O protocolo instituído no termociclador foi: 95° por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 94° a 30 segundos, 60° por 1 minuto, 72° por 1:30 minutos e uma extensão final de 72° por 7 minutos.

3.6. Eletroforese

Após realizar as análises moleculares, foram separados 10 µl de cada produto e aplicados em gel de agarose em uma concentração de 1,5% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®). A separação foi realizada por eletroforese a 75V (5V/cm). O gel foi corado com brometo de etídio (0,5µ/mL). A visualização foi feita em transiluminador de luz ultravioleta (L-PIX Sti, Locus). Para determinação aproximada do tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (100bp Ladder Plus, Ready To Use - Sinapse Inc - M1071) como referência.

3.7. Análise Filogenética

A análise filogenética foi realizada utilizando sequências do gene *msp1a* de *A. marginale* obtidas no presente estudo, juntamente com sequências adicionais recuperadas do banco de dados GenBank do NCBI (25.09.2025). Inicialmente, todas as sequências disponíveis reportadas do Brasil e de outros países das Américas foram baixadas. Para garantir a comparabilidade, apenas sequências com comprimento entre 400 e 800 nucleotídeos foram mantidas. Esse critério de comprimento foi aplicado porque sequências de tamanhos muito diferentes podem reduzir o número de posições homólogas no alinhamento, distorcer as estimativas de distância par-a-par e, conseqüentemente, comprometer a inferência filogenética. Sequências redundantes foram identificadas e excluídas utilizando a ferramenta online de alinhamento MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/>). Posteriormente, o banco de dados NCBI também foi examinado em busca de sequências reportadas de outros continentes. Os mesmos critérios de seleção quanto ao comprimento dos nucleotídeos foram aplicados, e as entradas redundantes foram removidas conforme descrito acima. O conjunto final de dados foi alinhado utilizando o algoritmo MUSCLE implementado no MEGA 11. As relações filogenéticas foram reconstruídas pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) com o modelo de substituição Kimura de 2 parâmetros (K2P). A robustez da topologia da árvore foi avaliada por meio de análise de *bootstrap* com 1000 repetições.

3.8. Identificação e caracterização das repetições em tandem do gene *msp1a*

A região de repetições em tandem (TR) do gene *msp1a* de *A. marginale* foi caracterizada para todas as sequências obtidas no presente estudo, bem como para as sequências de referência incluídas na análise filogenética. As sequências de nucleotídeos foram inicialmente traduzidas em aminoácidos utilizando a ferramenta online Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>) e a região N-terminal de *msp1a* foi inspecionada quanto à presença de repetições em tandem de aproximadamente 28–29 aminoácidos de comprimento, utilizando a ferramenta online disponibilizada pelo Instituto Europeu de Bioinformática da EMBL (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/>). Cada unidade repetitiva foi identificada por comparação com uma biblioteca de motivos de referência previamente descritos para isolados brasileiros e internacionais, incluindo, por exemplo, as repetições α , β , γ , τ e repetições numéricas (e.g., 22, 27, 14) (de la Fuente *et al.* 2001; de la Fuente *et al.* 2004; de la Fuente *et al.* 2007; Pereira *et al.* 2021; Arnuphappasert *et al.* 2023).

Para cada isolado, a estrutura completa de TR foi reconstruída por concatenação de todas as unidades repetitivas em sua ordem original. O número de repetições por sequência e o seu arranjo específico foram registrados. Além disso, a sequência Shine–Dalgarno (SD) e o códon de iniciação (ATG) foram identificados, e a distância entre eles (SD–ATG) foi calculada utilizando a fórmula $SD-ATG = 4m + 2n + 1$, onde m e n representam o número de nucleotídeos entre o resíduo C conservado e os sítios SD ou ATG, respectivamente. Essas informações foram utilizadas para classificar os isolados em genótipos previamente definidos, seguindo os critérios estabelecidos em estudos anteriores mencionados acima. O número e o arranjo das repetições foram registrados para cada isolado, e as distâncias SD–ATG foram calculadas para a atribuição dos genótipos conforme os critérios estabelecidos.

3.9. Variabilidade genética e diferenciação interpopulacional de sequências do gene *msp1a* de *Anaplasma marginale*

A diversidade genética dentro e entre grupos de sequências de *A. marginale msp1a* foi avaliada utilizando o software DnaSP v.6. Para cada grupo pré-definido (isolados do presente estudo, outras regiões do Brasil, Américas e conjunto global de dados), foram calculados índices padrão de diversidade, incluindo o número de haplótipos (H), a diversidade haplotípica ($Hd \pm DP$) e o número médio de diferenças nucleotídicas (k). Esses índices fornecem informações sobre o nível geral de variabilidade genética e a distribuição de polimorfismos de sequência dentro das populações.

Para avaliar se os padrões de polimorfismo observados se desviam das expectativas de neutralidade, foram realizados três testes de neutralidade: D de Tajima, D de Fu e Li e F de Fu e Li. Esses testes são amplamente utilizados para detectar sinais de eventos demográficos, como expansão populacional ou gargalos populacionais, bem como pressões seletivas atuando sobre o gene. Valores positivos ou negativos, quando significativos, podem indicar desvios da neutralidade devido à seleção ou à história demográfica, enquanto valores não significativos são consistentes com evolução neutra (Rozas *et al.*, 2017).

A diferenciação genética entre grupos de sequências foi analisada no DnaSP v.6 por meio de comparações pareadas. A distribuição dos polimorfismos de nucleotídeos foi contrastada entre grupos, e a significância da diferenciação foi avaliada com o teste do qui-quadrado. Duas medidas adicionais de diferenciação populacional foram calculadas: F_{st} , que quantifica a proporção da variância genética explicada pelas diferenças entre grupos, e D_{xy} , que representa o número médio de substituições nucleotídicas por sítio entre grupos. Em conjunto, esses índices forneceram medidas relativas e absolutas de divergência de sequências, permitindo identificar a estrutura genética entre grupos geográficos.

3.10 Análise estatística do manejo sanitário

Na comparação do percentual de positividade nos sistemas de criação e no manejo sanitário de cada propriedade foi realizado o teste qui-quadrado (χ^2) de independência para avaliar a existência de associação estatisticamente significativa entre variáveis qualitativas. Para cada comparação, os dados foram organizados em tabelas de contingência, apresentando as frequências observadas. A significância estatística foi avaliada com um nível de 5%.

4. RESULTADOS

Foram obtidas no total 388 amostras de sangue bovino no período de 2024 a 2025, distribuídas em oito fazendas em cidades do estado do Rio de Janeiro, sendo elas: Vassouras, Miguel Pereira, Seropédica, Teresópolis, Guapimirim, Volta Redonda e Piraí. Essas propriedades foram classificadas quanto ao manejo e condições sanitárias: satisfatório, regular ou precário utilizando-se como critério o manejo sanitário levando em consideração a presença ou ausência de dejetos e a limpeza das instalações dos animais, equipamentos de proteção dos tratadores, utilização de luvas no manejo, assepsia das mãos, botas e objetos e a observação do estado nutricional e de cuidado dos animais. Para avaliar a presença de vetores foi utilizado o sistema de cruzes onde: +++ alto, + raros e ausente para quando nenhum vetor foi observado (Tab. 1).

Tabela 1. Representação da avaliação do manejo, densidade de vetores e tipo de produção de cada propriedade de criação bovina do estado do Rio de Janeiro, utilizada no presente estudo.

Município	Manejo sanitário	Presença de carrapatos	Presença de moscas	Tipo de produção
Vassouras	Satisfatório	Ausência	Ausência	Corte
Piraí	Precário	+++	+++	Leite
Miguel Pereira	Precário	+++	+++	Leite
Seropédica	Precário	+++	+++	Leite
(Fazenda 1)				
Seropédica	Satisfatório	+	Ausência	Leite
(Fazenda 2)				
Teresópolis	Precário	+	Ausência	Leite
Volta Redonda	Regular	+++	+++	Leite
Guapimirim	Regular	Ausência	+	Leite

Nota: N (número de amostras sanguíneas); Presença baixa de carrapatos e moscas indicada por '+', presença alta indicada por '+++', ausência de vetores indicada por 'Ausência'.

A amplificação do gene endógeno *GAPDH* para confirmar se a extração de DNA das amostras sanguíneas demonstrou presença de DNA em todas as amostras.

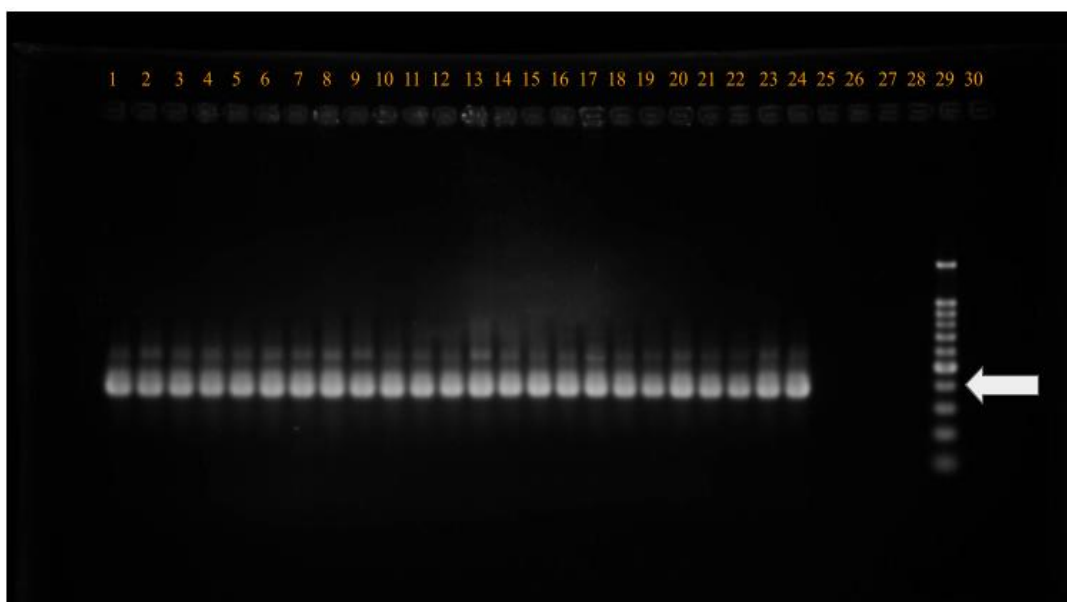


Figura 3. Representação dos produtos de uma parte das amostras da PCR para o gene *GAPDH* (200pb - seta branca), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®). O gel foi corado com brometo de etídio (0,5µ/mL) e separados por eletroforese (5V/cm), visualizados em transiluminador UV. Poço 1-24: amostras positivas. Poço 25-28: controles negativos. Poço 29: ladder.

Como controle positivo e para confirmar que o gene *msp4* é capaz de amplificar outras espécies de *Anaplasma* foi utilizado DNA de *Anaplasma platys*-like oriundo de cultivo celular (De Matos *et al.*, 2025).

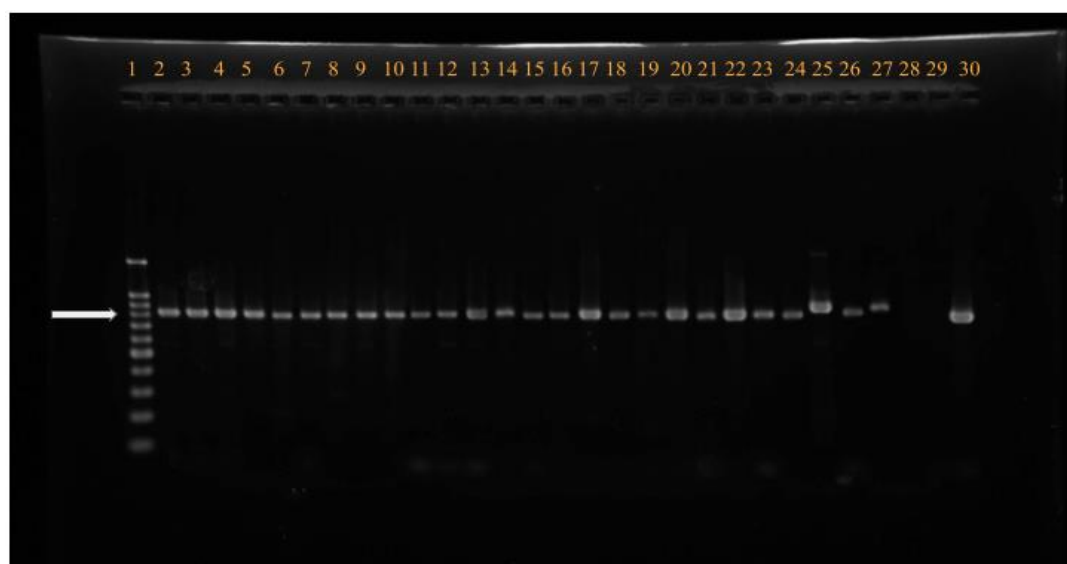


Figura 4. Representação dos produtos de PCR para o gene *msp4* (831 pb) de uma parte das amostras, aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®) corado com DSVIEW nucleic stain 20.000X (Sinapse Inc®) e separados por eletroforese (5V/cm), visualizados em transiluminador UV. Poço 1: ladder; Poço 2-27: amostras positivas (poços 25 e 27 - controles positivos de *Anaplasma platys*-like). Poço 28-29: controles negativos; Poço 30: controle positivo para *Anaplasma marginale*.

No gene *msp4* para *Anaplasma* spp. obteve-se 259 amostras positivas de 388 amostradas, com um percentual de 66,8% (Tabela 2). O percentual de animais positivos nas propriedades estudadas variou de 0,0 a 85,4%, no entanto, quando os sistemas de criação foram comparados, 69,73% (205/294) dos animais criados em sistemas convencionais e 57,45% (54/94) dos criados em sistemas orgânicos foram considerados positivos para *Anaplasma* spp., diferindo estatisticamente ($p=0,0278$). Quanto ao manejo sanitário de cada propriedade, o percentual de positividade não diferiu estatisticamente ($p=0,9407$), com 67,04% (59/88) dos animais oriundos de propriedades com manejo sanitário considerado satisfatório, 65,38% (68/104) dos animais oriundos de propriedades com manejo sanitário considerado regular e 67,35% (132/196) dos animais oriundos de propriedades com manejo sanitário considerado precário, considerados positivos para *Anaplasma* spp.

Tabela 2. Distribuição de amostras por município, número de positivos e percentual para *Anaplasma* spp. e sistemas de produção no estado do Rio de Janeiro.

Município	Total de Amostras	Amostras Positivas	% Positivas	Sistema de Produção
Vassouras	68	48	70.6	Convencional
Piraí	91	69	75.8	Convencional
Miguel Pereira	41	35	85.4	Orgânica
Seropédica	31	20	64.5	Convencional
(Fazenda 1)				
Seropédica	20	11	55.0	Orgânica
(Fazenda 2)				
Teresópolis	33	8	24.2	Orgânica
Volta Redonda	92	68	73.9	Convencional
Guapimirim	12	0	0.0	Convencional
Total	388	259	66.8	-

Foi enviada para sequenciamento pelo menos uma amostra de cada propriedade. Após sequenciamento do gene *msp1a* e a análise dos dados do programa BLASTn, foi possível localizar cepas com alto percentual de similaridade em relação às encontradas neste estudo. As sequências de Vassouras apresentaram 99,87% de similaridade com uma sequência da Tailândia (amostra 1) e 100% com sequências da Argentina e de Minas Gerais, Brasil (amostra 6). As sequências de Seropédica mostraram 100% de similaridade com sequências do Rio de Janeiro (amostra 53) e da Tailândia (amostra 61). Em relação à propriedade de Piraí, a amostra 55 apresentou 99,36% e a amostra 105, 98,53% de similaridade genética com sequências também oriundas do Rio de Janeiro. A amostra 70, da propriedade de Teresópolis, apresentou 100% de similaridade com uma sequência descrita em Cuba, enquanto a amostra 204, de Volta Redonda, obteve 99,1% de similaridade com uma sequência do Sul da África.

A análise das repetições em tandem confirmou um alto nível de variabilidade estrutural entre os isolados. Foram identificados oito perfis distintos de TR, com a maioria dos isolados atribuída ao genótipo E (SD-ATG = 23 nt), enquanto um isolado de Seropédica (61) foi classificado como genótipo E1 (SD-ATG = 25 nt) (Tab. 3).

Tabela 3. Estrutura de repetições em tandem de *msp1a*, genótipo, m, n e distância SD-ATG dos isolados de *Anaplasma marginale* no estado do Rio de Janeiro.

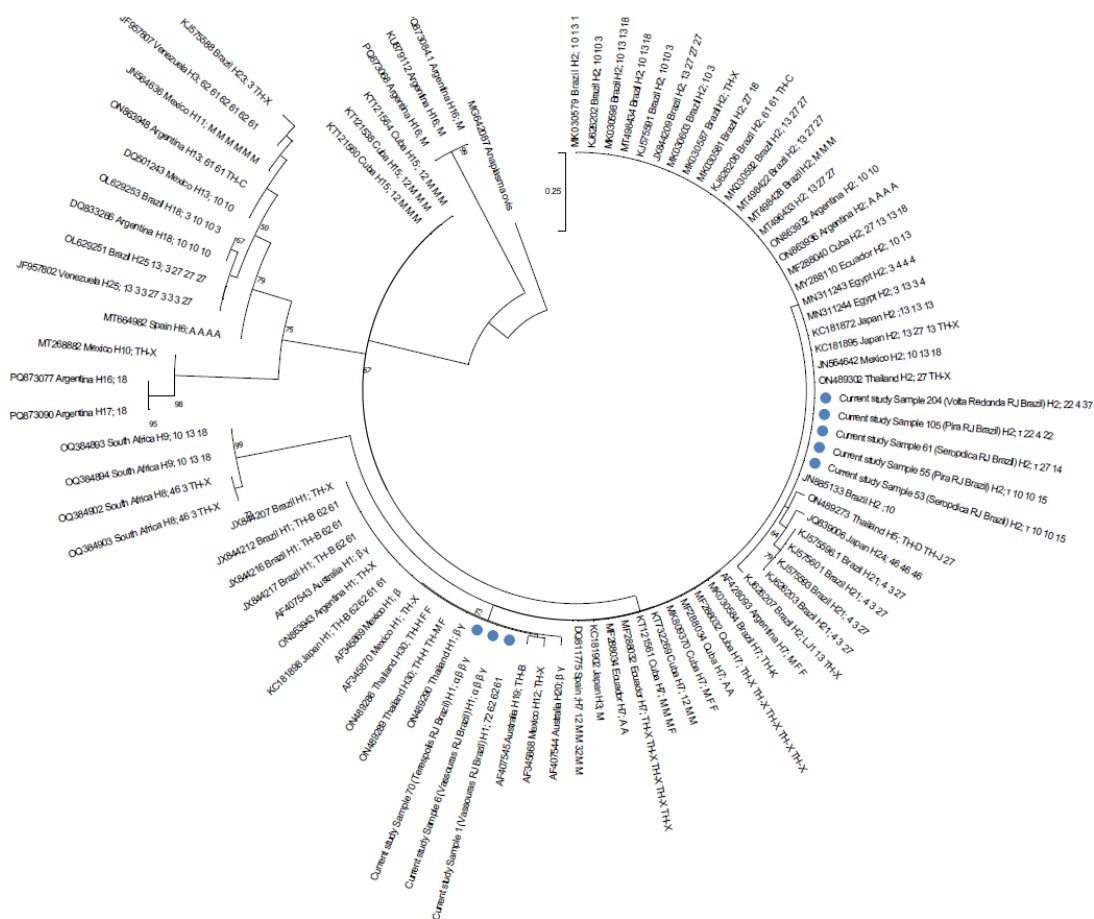
Cepa	Origem	Estrutura de repetições em tandem de <i>msp1a</i>	Genótipo	m*	n**	Distância SD-ATG
Amostra 1	Vassouras	72 62 62 61	E	2	7	23
Amostra 6	Vassouras	α β β γ	E	2	7	23
Amostra 53	Seropédica (Fazenda 1)	τ 10 10 15	E	2	7	23
Amostra 61	Seropédica (Fazenda 1)	τ 27 14	E1	2	8	25
Amostra 55	Piraí	τ 10 10 15	E	2	7	23
Amostra 105	Piraí	τ 22 4 22	E	2	7	23
Amostra 204	Volta Redonda	22 4 37	E	2	7	23
Amostra 70	Teresópolis	α β β γ	E	2	7	23

m* número de repetições da sequência do nucleotídeo G/ATTT

n** número de repetições da sequência do nucleotídeo G

A análise filogenética do gene *msp1a* de *A. marginale* revelou que as cepas obtidas no presente estudo se agruparam em duas principais linhagens. As amostras 1, 6 e 70 agruparam-se dentro do clado H1, juntamente com sequências de referência do Brasil, México e Japão. Em contraste, as amostras 53, 55, 61, 105 e 204 foram posicionadas no clado dominado pelo haplótipo H2, misturadas com isolados previamente reportados do Brasil, Argentina, Cuba, Tailândia e Egito (Fig. 5). Esses achados demonstram a cocirculação de pelo menos duas linhagens distintas de *msp1a* em bovinos do Rio de Janeiro, refletindo tanto a diversidade local quanto conexões evolutivas com cepas descritas nas Américas e em outros continentes.

Figura 5. Árvore filogenética baseada em sequências nucleotídicas do gene *msp1a* de *Anaplasma marginale* obtidas no presente estudo (destacadas) e sequências de referência recuperadas do GenBank. As sequências foram alinhadas utilizando o MUSCLE no MEGA 11, e a árvore foi reconstruída pelo método de Máxima Verossimilhança sob o modelo de substituição de Kimura de 2 parâmetros. Os valores de *bootstrap* foram calculados com 1000 replicações, e apenas valores acima de 60% são mostrados nos nós. Para cada sequência, o perfil correspondente de repetições em tandem é indicado, sendo que os padrões identificados no presente estudo correspondem aos resumidos na Tabela 3.



Os índices de diversidade genética também sustentaram a presença de variação substancial dentro e entre grupos. Os valores de diversidade haplotípica foram uniformemente altos no presente estudo, no Brasil, nas Américas e em conjuntos globais de dados ($H_d \approx 0,96-0,99$), enquanto o número médio de diferenças nucleotídicas (k) variou entre os grupos (Tabela 4). Os testes de neutralidade apresentaram valores não significativos ($p > 0,05$) em todas as comparações, indicando que os padrões de polimorfismo observados são consistentes com evolução neutra e não fornecem evidências de fortes pressões seletivas atuando sobre gene *msp1a* de *A. marginale* nas populações estudadas (Tab. 4).

Tabela 4. Índices de diversidade genética e estatísticas dos testes de neutralidade do gene *msp1a* de *Anaplasma marginale*: comparação entre isolados do presente estudo, de outras regiões do Brasil, das Américas e em nível global.

Região amostrada	Índice de diversidade			Teste de neutralidade		
	Número de haplótipos	Hd $\pm$ SD	K	Tajima's D	Fu and Li D	Fu and Li F
Presente estudo	2	0.964 $\pm$ 0.077	21.821	0.589; p > 0.05	0.547; p > 0.05	0.621; p > 0.05
Brasil	19	0.966 $\pm$ 0.019	18.388	- 0.529; p > 0.05	0.770; p > 0.05	0.407; p > 0.05
Américas	21	0.968 $\pm$ 0.020	24.146	0.099; p > 0.05	1.128; p > 0.05	0.927; p > 0.05
Global	17	0.988 $\pm$ 0.021	13.754	- 1.329; p > 0.05	- 0.695; p > 0.05	- 1.028' p > 0.05

Além disso, comparações pareadas entre grupos de sequências demonstraram uma diferenciação genética moderada, mas detectável. Embora os valores de F_{st} entre as cepas do presente estudo e outras sequências brasileiras tenham sido baixos (0,043), valores mais altos foram observados em comparações com sequências de conjuntos globais (0,078), acompanhados por valores elevados de D_{xy} (Tabela 5). Esses resultados sugerem que, embora as cepas do Rio de Janeiro (presente estudo) permaneçam estreitamente relacionados àquelas que circulam no Brasil, elas também contribuem para a heterogeneidade genética mais ampla de *A. marginale* observada entre continentes.

Tabela 5. Diferenciação genética pareada (teste de significância χ^2 , Fst e Dxy) entre grupos de sequências *msp1a* de *Anaplasma marginale*: comparação dos isolados do presente estudo com aqueles do Brasil, das Américas e de conjuntos globais de dados.

Índices de diferenciação genética e origem das amostras		Presente estudo	Brasil	Global
Distribuição dos polimorfismos de nucleotídeos (χ^2)	Presente estudo			
	Brasil	26.357; df = 19 p = 0.236		
	Américas	31.640; df = 19 p = 0.136	46.902; df = 25 p = 0.025*	
	Global	17.408; df = 18 p = 0.492	32.418; df = 23 p = 0.179	24.639; df = 14 p = 0.135
<i>Fst</i>	Presente estudo			
	Brasil	0.043		
	Américas	0.166	0.112	
	Global	- 0.007	0.032	0.078
<i>Dxy</i>	Presente estudo			
	Brasil	0.069		
	Américas	0.1718	0.192	
	Global	0.084	0.117	0.206

*estatisticamente significativo.

4. DISCUSSÃO

A escolha dos genes *msp4* e *msp1a* para as análises realizadas neste estudo baseia-se em suas características complementares na investigação de *A. marginale*. O gene *msp4* apresenta baixa variabilidade entre isolados, sendo altamente conservado, o que o torna um marcador confiável para triagem e detecção da bactéria, permitindo identificar a presença do agente com elevada especificidade (Oberle; Palmer; Barbet, 1993). Em contrapartida, o gene *msp1a* contém regiões hipervariáveis compostas por repetições em tandem, indicando como a bactéria se adapta a diferentes hospedeiros e condições ambientais. Essa característica confere ao *msp1a* grande potencial para estudos de variabilidade genética, possibilitando a diferenciação entre isolados e compreensão de possíveis mecanismos de evasão imunológica (Allred *et al.*, 1990). Dessa forma, a utilização conjunta desses dois genes permite não apenas assegurar a detecção de *Anaplasma* spp., mas também explorar a diversidade genética das linhagens circulantes, ampliando a compreensão da dinâmica epidemiológica do agente.

Estudos presentes na literatura relatam a prevalência de *A. marginale*, através da técnica de PCR, em diferentes regiões brasileiras. Na região Norte foram relatados 92,87% no Acre e 98,6% em Rondônia (Brito *et al.*, 2010). Na região Nordeste: 17,1% no Semiárido Paraibano (Costa *et al.*, 2018), 67,4% no Maranhão (Pereira *et al.*, 2021), 61,46% no Pará (Monteiro *et al.*, 2024) e 76,2% na bacia leiteira do Piauí (Souza *et al.*, 2013). Na região Sudeste: 55,6% no Noroeste de Minas Gerais (Bahia *et al.*, 2020) e 66,8% na região do Rio de Janeiro, no presente trabalho. A variação observada entre os estados demonstra dinâmicas de transmissão heterogêneas, provavelmente influenciadas por diferenças microclimáticas, topográficas e de manejo sanitário.

Locais com temperaturas mais elevadas tendem a apresentar maior propensão ao desenvolvimento de carrapatos, uma vez que o aumento da temperatura favorece tanto a reprodução quanto o ciclo de vida desses artrópodes. Este fenômeno pode ser observado no percentual reduzido de *Anaplasma* spp. registrados na região de Teresópolis durante o presente estudo, embora a propriedade analisada apresente manejo inadequado. O resultado pode ser associado ao período de coleta realizado no mês de inverno (julho), bem como às características geográficas da região serrana, reconhecida por apresentar médias baixas de temperatura durante o inverno, fator que pode limitar o crescimento populacional dos carrapatos (Castañeda Arriola *et al.*, 2021; Oshiro *et al.*, 2021).

De acordo com os conceitos sobre instabilidade e estabilidade enzoótica de Mahoney & Ross (1972), a região Norte do Brasil se classifica como área de estabilidade, enquanto Nordeste e Sudeste são áreas de instabilidade, incluindo as propriedades desse trabalho. Na maioria dos casos, regiões de instabilidade enzoótica são regiões de criação extensiva com baixo nível de infestação por carrapatos ou onde animais jovens não entram em contato com a bactéria. Nesses locais, introduções de animais infectados podem causar surtos severos.

São escassos os trabalhos que utilizam biologia molecular para a detecção de *A. marginale* no estado do Rio de Janeiro. Uma pesquisa realizada na Baixada Fluminense testou 21 bezerros com 13 dias de vida e obteve 100% de positividade por meio da amplificação do gene *msp5* (Silva, 2012). Silva *et al.* (2015) relataram uma variação de 15% em recém-nascidos e 100% em animais com 90 dias de idade, através da qPCR, na cidade de Seropédica, também localizada na Baixada Fluminense. Chagas *et al.* (2025) encontraram 73,5% de prevalência em Vassouras, município do Rio de Janeiro, pela técnica de PCR (dados em fase de publicação). Por outro lado, a literatura apresenta estudos de soroprevalência por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Souza *et al.* (2000) relataram 91,16% de positividade para o agente em nove municípios da mesorregião Norte Fluminense, enquanto Souza *et al.* (2001) observaram 98,21% na mesorregião do Médio Paraíba (RJ). Entretanto, é importante destacar que os métodos diagnósticos apresentam princípios distintos: enquanto o ELISA indica

exposição prévia ao agente pela detecção de anticorpos, a PCR (incluindo qPCR) permite a identificação direta do DNA do patógeno, evidenciando infecção ativa. Assim, os parâmetros de avaliação diferem significativamente, o que dificulta a comparação direta entre os resultados obtidos por cada técnica (Marana *et al.*, 2006; Valones *et al.*, 2009).

Em relação aos sistemas de criação, deve-se destacar que não é possível comparar os percentuais de positividade e nem correlacionar de forma confiável, devido à variabilidade no tamanho dos rebanhos amostrados (Pajoro *et al.*, 2024). Estudos que realizem comparações de hemoparasitoses em rebanhos orgânicos e convencionais são praticamente inexistentes na literatura. Foram identificadas apenas algumas referências, incluindo três estudos realizados na Europa (Chincarini *et al.*, 2022; Takeuchi-Storm *et al.*, 2019; Nosal *et al.*, 2025), entretanto, estes foram relacionados principalmente a parasitos gastrointestinais. Uma revisão sistemática realizada em bovinos leiteiros, que investigou o impacto da abordagem orgânica, convencional e intensiva na circulação de agentes infecciosos, sugeriu que o tipo de sistema de criação não influencia de forma significativa a circulação desses agentes (Pajoro *et al.*, 2024). Dessa forma, é fundamental que novas pesquisas sobre hemoparasitoses em criações orgânicas sejam publicadas, a fim de suprir a atual lacuna de informações existentes na literatura sobre o tema.

Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre os diferentes manejos sanitários no presente estudo, um manejo adequado na bovinocultura está diretamente associado à redução do estresse e à manutenção de boas condições nutricionais, fatores essenciais para o fortalecimento da imunidade dos animais. Nesse contexto, destaca-se que parasitos externos representam uma importante fonte de estresse, comprometendo o bem-estar, a resposta imunológica e, conseqüentemente, a produtividade do rebanho (NCAT, 2015). Foram encontrados outros estudos que associam o manejo sanitário inadequado à ocorrência de hemoparasitoses (Brito *et al.*, 2007; Ono *et al.*, 2017; Kemer *et al.*, 2020). As práticas inadequadas de higiene nas propriedades também foram relacionadas à ocorrência de vetores, já que muitas vezes o acúmulo de matéria orgânica serve de substrato para o desenvolvimento dos mesmos e o sucesso do estabelecimento desses parasitas é um fator determinante para a manutenção do ciclo de hemoparasitoses nos rebanhos (Andrade Junior, 2021; Mor *et al.*, 2024).

Na análise de similaridade do gene *msp1a*, os dados observados podem ser explicados pelo elucidado por Vidotto *et al.* (2006), de que a aquisição de animais provenientes de diversos rebanhos constitui uma das principais formas de introdução de diferentes cepas de *A. marginale*, tanto de outras regiões do Brasil quanto de outros países. A caracterização molecular baseada no gene *msp1a* revelou a presença de duas principais linhagens filogenéticas (H1 e H2), evidenciando a coexistência de múltiplos haplótipos de *A. marginale* dentro dos rebanhos no estado. Essa diversidade sugere fluxo gênico entre populações regionais e apoia a hipótese de que a movimentação de animais entre fazendas desempenha um papel fundamental na introdução e manutenção de variantes (Estrada-Peña *et al.*, 2009).

As repetições em tandem revelaram uma diversidade de cepas, no entanto, a cepa τ -10-10-15, identificada em Seropédica e Piraí, foi associada à transmissão transplacentária em estudo conduzido por Silva *et al.* (2015) com bezerros de até um ano no Rio de Janeiro. Já a cepa α - β - β - γ , encontrada em Vassouras e Teresópolis, havia sido previamente descrita em Minas Gerais por Pohl *et al.* (2013) e também demonstrou relação com a transmissão transplacentária, uma vez que foi detectada em bezerros recém-nascidos, com apenas um dia de vida. A recorrência desses achados no Rio de Janeiro sugere a continuidade de genótipos circulantes semelhantes aos previamente reportados na América do Sul. A persistência desses genótipos em diferentes municípios sugere uma adaptação bem-sucedida do agente a múltiplas vias de infecção, potencialmente contribuindo para a sua manutenção em áreas endêmicas, independentemente da sazonalidade do vetor.

O estudo realizado por Estrada-Peña *et al.* (2009) descreveu uma correlação entre o comprimento da região SD–ATG (variando de 19 a 29 nucleotídeos) do microsatélite MSP1a e o nível de expressão gênica, que influencia diretamente a infectividade e a capacidade de transmissão de *A. marginale*. Cepas com uma distância SD–ATG de 19 nucleotídeos exibiram menor expressão de MSP1a, enquanto aquelas com 23 ou 29 nucleotídeos mostraram níveis de expressão mais altos. Consistentemente, Parodi *et al.* (2022) relataram que 88% (53/60) das cepas analisadas correspondiam a genótipos com uma distância SD–ATG de 23 nucleotídeos, sugerindo um maior potencial infectivo para essas variantes. Esses achados corroboram os resultados do presente estudo, no qual sete sequências exibiram uma distância de 23 nucleotídeos e uma mostrou uma distância de 25 nucleotídeos.

A predominância do genótipo E, identificado na maioria das amostras, é consistente com achados anteriores no Brasil e em outros países da América do Sul (Estrada-Peña *et al.*, 2009; Pohl *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2015; De Souza Ramos *et al.*, 2019; Parodi *et al.* 2022), onde este genótipo tem sido descrito como o mais amplamente distribuído. A detecção de uma variante relacionada (E1) em Seropédica representa um achado relevante, possivelmente indicando a ocorrência de mutações pontuais ou a introdução de uma linhagem exógena.

Os altos índices de diversidade de haplótipos ($H_d > 0,96$) e os testes de neutralidade não significativos (D de Tajima, D e F de Fu e Li; $p > 0,05$) indicam que a variabilidade observada é consistente com um padrão evolutivo neutro, sem forte pressão seletiva atuando sobre o gene *msp1 α* . Esse padrão pode refletir uma história demográfica de populações estáveis, mantida por deriva genética e sucessivas introduções de cepas intimamente relacionadas. A leve diferenciação genética entre os isolados deste estudo e os de outras regiões brasileiras ($F_{st} = 0,043$), juntamente com valores de comparação global mais altos ($F_{st} = 0,078$) e D_{xy} elevado, sugere uma conectividade genômica predominante em nível nacional, com contribuições externas aumentando a heterogeneidade genética geral do agente.

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou uma grande diversidade genética de *Anaplasma marginale* nas fazendas do Estado do Rio de Janeiro, além da alta prevalência do agente.

As análises filogenéticas demonstraram a cocirculação de pelo menos duas linhagens distintas (H1 e H2), geneticamente relacionadas a isolados de outros estados brasileiros e de diferentes continentes. A predominância do genótipo E e a detecção pontual da variante E1 indicam a coexistência de linhagens locais e de possíveis introduções de cepas exógenas.

A ausência de associação estatística entre o manejo sanitário e a infecção observada neste estudo pode refletir a alta endemicidade da região e limitações do método de classificação, não permitindo conclusões definitivas sobre o impacto do manejo na ocorrência do agente.

Esses achados reforçam a necessidade de estratégias integradas de controle que considerem o monitoramento molecular contínuo, o manejo racional de vetores e a rastreabilidade de animais entre propriedades.

Dessa forma, o objetivo de caracterizar a diversidade genética de *A. marginale* em rebanhos bovinos do RJ foi alcançado, fornecendo dados inéditos para o estado e complementando o cenário epidemiológico nacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLRED, D. R. et al. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 8, p. 3220-3224, 1990.
- ANDRADE JUNIOR, A. L. F. de. Prevalência de hemoparasitas em bovinos na microrregião do brejo paraibano. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Federal da Paraíba. 2021.
- ARAÚJO, F. R. et al. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, p. 139-148, 2003.
- ARAÚJO, T. R. et al. First report of the presence of *Anaplasma marginale* in different tissues of the stable-fly *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) in Rio de Janeiro state, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 23, p. 100515, 2021.
- ARNUPHAPPRASERT, A. et al. Genetic characterization of genes encoding the major surface proteins of *Anaplasma marginale* from cattle isolates in Thailand reveals multiple novel variants. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 14, n. 2, p. 102110, 2023.
- BAÊTA, B. A. et al. Characterization of two strains of *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Rio de Janeiro, Brazil, after propagation in tick cell culture. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 141-145, 2015.
- BAHIA, M. et al. Characterization of cattle tick fever in calves from the northwestern region of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 1, p. e017119, 2020.
- BAHIA, M. et al. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves with anaplasmosis on farms in Minas Gerais, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 1, p. 101552, 2021.
- BAUTISTA, C. R. et al. Molecular detection of *Anaplasma marginale* in stable flies *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) feeding on a tick-free bovine herd. **Veterinaria México OA**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2018.
- BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003.
- BIZI, G. M. S. Produção de bovinos de corte da raça Nelore: uma análise econômica comparativa do sistema extensivo e semi-intensivo. 2018. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Administração). Universidade Federal de Rondônia, Cacoal, 2018.
- BRITO, L. G. B. et al. Estratégias de prevenção e controle da tristeza parasitária bovina (TPB) a partir da avaliação molecular da infecção em rebanhos criados em diferentes regiões fisiográficas dos estados de Rondônia e Acre. Embrapa Rondônia, 2007.
- BRITO, L. G. B. et al. *Anaplasma marginale* infection in cattle from south-western Amazonia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 249-254, 2010.
- CABEZAS-CRUZ, A. et al. Functional and immunological relevance of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a sequence and structural analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65243, 2013.
- CASTANEDA ARRIOLA, R. O. et al. *Rhipicephalus microplus* infestation level and its association with climatological factors and weight gain in *Bos taurus* x *Bos indicus* cattle. **Revista mexicana de ciencias pecuarias**, v. 12, n. 1, p. 273-285, 2021.
- CASTANEDA-ORTIZ, E. J. et al. Association of *Anaplasma marginale* strain superinfection with infection prevalence within tropical regions. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. 1-12, 2015.
- CAVALIER-SMITH, T. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 7-76, 2002.

CHINCARINI, M. et al. Animal welfare and parasite infections in organic and conventional dairy farms: A comparative pilot study in Central Italy. **Animals**, v. 12, n. 3, p. 351, 2022.

CONNELL, M.; HALL, W. T. K. Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 48, n. 8, p. 477, 1972.

CONNELL, M. L. Transmission of *Anaplasma marginale* by the cattle tick *Boophilus microplus*. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**, v. 31, n. 3, p. 185-193, 1974.

COSTA, S. C. et al. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 7, n. 2, p. 270-275, 2016.

COSTA, V. M. M. et al. Incidência de *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 605-612, 2018.

DE LA FOURNIERE, S. et al. Transovarial transmission of *Anaplasma marginale* in Rhipicephalus (Boophilus) microplus ticks results in a bottleneck for strain diversity. **Pathogens**, v. 12, n. 8, p. 1010, 2023.

DE LA FUENTE, J. et al. 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, 2001.

DE LA FUENTE, J. et al. 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. et al. 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. et al. 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 MATOS, E. R. et al. Isolation, molecular characterization and in vitro propagation of an *Anaplasma platys*-like bacterium in tick cells. **Pathogens**, v. 14, n. 9, p. 901, 2025.

DE SOUZA RAMOS, I. A. et al. 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.

DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

ESCOSTEGUY, A.; JANTZEN, M. M. Manual da pecuária orgânica: ruminantes: normas da Portaria MAPA nº 52/2021. Porto Alegre: UFRGS, 2024.

ESTEVES, E. et al. Low temperature affects cattle tick reproduction but does not lead to transovarial transmission of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 214, n. 3-4, p. 322-326, 2015.

ESTRADA-PEÑA, A. et al. 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.

FEDORINA, E. A. et al. Molecular survey and genetic characterization of *Anaplasma marginale* isolates in cattle from two regions of Russia. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 10, n. 2, p. 251-257, 2019.

GARRITY, G. M. et al. Systematic bacteriology. **The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria**, Bergey's Manual Trust, Department of Microbiology and Molecular Genetics, v. 2, 2005.

GARRITY, George M.; BELL, Julia A.; LILBURN, Timothy. Class I. Alphaproteobacteria class. nov. In: **Bergey's manual® of systematic bacteriology**. Springer, Boston, MA, 2005. p. 1-574.

GOMES, E. M. et al. Manejo e bem-estar animal na bovinocultura de corte no Brasil: uma revisão de literatura. **REMUNOM**, v. 7, n. 1, p. 1-23, 2025.

GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, p. 187-194, 2000.

GRAU, H. E. G. et al. 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.

GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

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

HELLER, L. M. et al. Evaluation of mechanical transmission of *Anaplasma marginale* by *Stomoxys calcitrans*. **Research in Veterinary Science**, v. 190, p. 105655, 2025.

HOFFMANN, A. Wolbachia. *Current Biology: CB*, v. 30, n. 19, p. R1113–R1114, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.039>. Acesso em: 29 junho. 2025.

HUANG, X. B. et al. The global distribution and risk prediction of Anaplasmataceae species: a systematic review and geospatial modelling analysis. **EBioMedicine**, v. 115, 2025.

HYBNER, B. R.; ALVES, A. F. A trajetória das políticas de incentivo à agricultura orgânica no Brasil e no Paraná. **Desenvolvimento Socioeconômico em Debate**, v. 10, n. 1, p. 210-234, 2024.

KEMER, A. **Manejo sanitário, resistência à carrapaticidas e prevalência dos agentes da tristeza parasitária bovina em propriedades leiteiras do planalto serrano catarinense, sul do Brasil**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais). Universidade Federal de Santa Catarina, 2020.

KHALIL, W. **Análise dos fluxos de informação e sua inter-relação com a rastreabilidade da carne bovina: a visão das certificadoras sobre a adesão ao Sistema Brasileiro de Identificação Individual de Bovinos e Búfalos (SISBOV)**. Dissertação (Mestrado em Administração). Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

KOCAN, K. M. et al. Adaptations of the tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, for survival in cattle and ticks. **Experimental & Applied Acarology**, v. 28, n. 1, p. 9-25, 2002.

KOCAN, K. M. et al. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.

KOCAN, K. M. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, p. 95-107, 2010.

KUTTLER, K. L. A study of the immunological relationship of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale*. **Research in veterinary science**, v. 8, n. 4, p. 467-471, 1967.

KUTTLER, K. L. Anaplasma infections in wild and domestic ruminants: a review. **Journal of wildlife diseases**, v. 20, n. 1, p. 12-20, 1984.

IERARDI, R. A. A review of bovine anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) with emphasis on epidemiology and diagnostic testing. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 37, n. 4, p. 517-538, 2025.

LEATCH, G. Preliminary studies on the transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 49, n. 1, p. 16-19, 1973.

LEW, A. E.; BOCK, R. E.; MINCHIN, C. M.; MASAKA, S. A msp1α polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 325-335, 2002.

LIMA, D. H. et al. Experimental infection by *Anaplasma marginale* in buffaloes and cattle: clinical, hematological, molecular and pathological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, p. 700-709, 2019.

LIMA, T. M. G. et al. Métodos alternativos no controle de carrapatos na pecuária leiteira orgânica. **Cadernos de Agroecologia**, v. 19, n. 1, 2024.

LUNA, F. V.; KLEIN, H. S. A evolução da pecuária bovina no Brasil. **História Econômica & História de Empresas**, v. 26, n. 3, p. 561-598, 2023.

MACHADO, R. Z. et al. 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.

MAHMMOD, S. L. et al. Occurrence of anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) in cattle in Sulaimani province, Kurdistan region of Iraq. **Passer Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 180-186, 2021.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. **Aust. Vet. J.** 48, 292-298, 1984.

MAGUNDA, F. et al. *Anaplasma marginale* actively modulates vacuolar maturation during intracellular infection of its tick vector, *Dermacentor andersoni*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 15, p. 4715-4731, 2016.

MARANA, E. R. M. et al. Comparação dos testes sorológicos de Imunofluorescência Indireta, Conglutinação Rápida, ELISA indireto e ELISA por competição para a detecção de anticorpos contra o *Anaplasma marginale* em soros de bovinos de diferentes áreas enzoóticas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 629-638, 2006.

MARTINS, K. R. et al. Correlation between *Rhipicephalus microplus* ticks and *Anaplasma marginale* infection in various cattle breeds in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 81, n. 4, p. 585-598, 2020.

MAZZUCCO PANIZZA, M. N. et al. Migration of *Rhipicephalus microplus* ticks among cattle. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 37, n. 2, p. 418-421, 2023.

MEDINA-NARANJO, V. L. et al. Diagnosis of hemotropic *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. and *Babesia* spp. by ELISAi and PCR techniques in three livestock farms of Pastaza Province, Ecuador. **Revista Científica**, v. XXVII, n. 3, p. 162-171, 2017.

MONTEIRO, M. V. et al. Infecção natural por *Anaplasma marginale* durante as primeiras semanas de vida de bezerros de uma propriedade leiteira da Amazônia Oriental. **Ciência Rural**, v. 54, p. e20230255, 2024.

MOR, N. H. et al. Hemoparasitism in grazing cattle and risk factors associated with husbandry management in an endemic area of Eastern Colombia. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 48, n. 4, p. 924-935, 2024.

MOURA, A. C. B. **Análise comparativa de técnicas moleculares para diagnóstico de hemoparasitoses em búfalos e bovinos naturalmente infectados no estado do Amapá**. Dissertação. Universidade Federal Rural da Amazônia, 2023.

MOURA, A. C. et al. Loop-mediated isothermal amplification test as an alternative for molecular diagnosis of natural infection by *Anaplasma marginale*. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 19, n. 1, 2025.

MOURO, G. F.; DINIZ, E. R.; DE PAIVA, F. A. Ações integradas para a construção de sistemas mais sustentáveis e para a produção orgânica de leite. **Revista Difusão**, v. 1, n. 7, 2021.

MUÑOZ-GUARNIZ, T. R. et al. Prevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos de la provincia Zamora Chinchipe, Ecuador. **Revista de Salud Animal**, v. 39, n. 1, p. 68-74, 2017.

NCAT (National Center for Appropriate Technology). Tipsheet: Organic management of internal and external livestock parasites. 2015. Disponível em: <https://attra.ncat.org>.

NOSAL, P. et al. Parasitic infections in the organic beef cattle herds of southern Poland during the grazing season, with the first record of *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) in the country. **Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 1, p. 59-69, 2025.

OBERLE, S. M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F. Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 12, p. 5245-5251, 1993.

ONO, M. S. B. et al. Surto de *Trypanosoma vivax* em rebanhos bovinos na Zona da Mata do estado de Pernambuco. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 11, n. 2, p. 96-101, 2017.

OSHIRO, L. M. et al. Effect of low temperature and relative humidity on reproduction and survival of the tick *Rhipicephalus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 83, n. 1, p. 95-106, 2021.

PAJORO, M. et al. Do organic, conventional, and intensive approaches in livestock farming have an impact on the circulation of infectious agents? A systematic review, focused on dairy cattle. **BioRxiv**, p. 2024.02.20.581183, 2024.

PANIZZA, M. M. et al. Assays to evaluate the transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 311, p. 109808, 2022.

PARODI, P. et al. Characterization of strains of *Anaplasma marginale* from clinical cases in bovine using major surface protein 1a in Uruguay. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 990228, 2022.

PEREIRA, J. G. et al. High genetic diversity of *Anaplasma marginale* infecting dairy cattle in northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, p. e014321, 2021.

POHL, A. E. et al. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 129-135, 2013.

PRUNEAU, L. et al. Understanding Anaplasmataceae pathogenesis using "Omics" approaches. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, p. 86, 2014.

PUNTES, J. D.; RIET-CORREA, F. Epidemiological aspects of cattle tick fever in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 32, n. 1, p. e014422, 2023.

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, p. 9032085, 2016.

RAMOS, C. A. N. et al. Comparação entre diversos antígenos para o diagnóstico de *Anaplasma marginale* por ELISA. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 37-41, 2010.

RAMOS, D. A. **Agricultura orgânica no Brasil: desafios e breve análise do Censo Agropecuário de 2017**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Integração Latino-Americana, 2022.

RAVINDRAN, R. et al. Transovarial transmission of pathogenic protozoa and rickettsial organisms in ticks. **Parasitology Research**, v. 122, n. 3, p. 691-704, 2023.

ROZAS, J. et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. **Molecular biology and evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299-3302, 2017.

RUYBAL, P. et al. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1-2, p. 176-180, 2009.

SALMON, D. E.; SMITH, T. Infectious diseases of cattle: Southern Cattle Fever (Texas Fever). In: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Special report on diseases of cattle and on cattle feeding. Washington, DC: Government Printing Office, Bureau of Animal Industry, 1986. p. 428-438.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, G. B. et al. Tristeza Parasitária em bovinos do semiárido pernambucano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1-7, 2017.

SILAGHI, C. et al. Guidelines for the direct detection of *Anaplasma* spp. in diagnosis and epidemiological studies. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 12-22, 2017.

SILVA, F. J. M. da. **Detecção de *Anaplasma marginale* por pesquisa de IgG e PCR em um rebanho bovino da Baixada Fluminense**. 2012. 57 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

SILVA, J. B. et al. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* studied longitudinally under natural transmission conditions in Rio de Janeiro, Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 6, n. 4, p. 499-507, 2015.

SILVA, R. P. B. et al. Diagnóstico parasitológico da Tristeza Parasitária Bovina na Bahia—Estudo retrospectivo de 2017 a 2021. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e28511225584, 2022.

SOTT, T. et al. Enzootic instability for bovine anaplasmosis on family farms located in southwestern Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 497-500, 2016.

SOUZA, J. C. P. et al. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 97-101, 2000.

SOUZA, J. C. P. de et al. Prevalência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do médio Paraíba. **Ciência Rural**, v. 31, p. 309-314, 2001.

SOUZA, F. de A. et al. Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in Northeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 1057-1061, 2013.

TAKEUCHI-STORM, N. et al. Parasite control in organic cattle farming: Management and farmers' perspectives from six European countries. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 18, p. 100329, 2019.

TEBELE, N.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Induction of protective immunity by using *Anaplasma marginale* initial body membranes. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 9, p. 3199-3204, 1991.

THEILER, A. C. M. G. *Anaplasma marginale*. **Annals of the Transvaal Museum**, v. 2, n. 2, p. 53-55, 1910.

VALONES, M. A. A. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 1-11, 2009.

VEGA, L. E. O. et al. *Anaplasma marginale* field challenge: Protection by an inactivated immunogen that shares partial sequence of msp1 α variable region with the challenge strain. **Vaccine**, v. 25, n. 3, p. 519-525, 2007.

VIDOTTO, O.; MARANA, E. R. M. Diagnóstico em anaplasmoze bovina. **Ciência Rural**, v. 31, p. 361-368, 2001.

VIDOTTO, M. C. et al. 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.

WEBER, J.; SILVA, T. N. da. A produção orgânica no Brasil sob a ótica do desenvolvimento sustentável. **Desenvolvimento em Questão: Revista do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento**, Ijuí, v. 19, n. 54, p. 164–184, 2021.

ZABEL, S.; AGUSTO, F. B. Modeling the transmission dynamics of bovine anaplasmosis. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0199780, 2018.

ANEXO I



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da diversidade genética de Babesia bovis e Babesia bigemina das diferentes regiões do Brasil", protocolada sob o CEUA nº 1051220524 (ID 002821), sob a responsabilidade de **Bruna de Azevedo Baêta e equipe; Maiara Vasconcelos Monteiro; Matheus Dias Cordeiro ; Juliano Martins Santiago; Claudia Bezerra da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 15/07/2024.

We certify that the proposal "Study of the genetic diversity of Babesia bovis and Babesia bigemina f.r.o.m different regions of Brazil", utilizing 1920 Bovines (males or females), protocol number CEUA 1051220524 (ID 002821), under the responsibility of **Bruna de Azevedo Baêta and team; Maiara Vasconcelos Monteiro; Matheus Dias Cordeiro ; Juliano Martins Santiago; Claudia Bezerra da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 07/15/2024.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **07/2024 a 06/2028** Área: **Parasitologia Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos ou Fêmeas**

idade: **4 a 240 meses**

Quantidade: **1920**

Linhagem: **todas as raças**

Peso: **100 a 600 kg**

Seropédica, 13 de dezembro de 2024

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro

Prof. Dr. Daniel de Almeida Balthazar
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro

