

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Caracterização molecular de *msp1* α da cepa AmRio1 de *Anaplasma marginale* em bezerro e carrapatos experimentalmente infectados.

Priscilla Nunes dos Santos

2016



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

Caracterização molecular de *msp1* α da cepa AmRio1 de *Anaplasma marginale* em bezerro e carrapatos experimentalmente infectados.

PRISCILLA NUNES DOS SANTOS

Sob a Orientação do Professor
Aivaldo Henrique da Fonseca

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2016

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

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

S237c Santos, Priscilla Nunes dos, 1990-
Caracterização molecular de msp1 alfa da cepa AmRio1 de Anaplasma marginale em bezerro e carrapatos experimentalmente infectados / Priscilla Nunes dos Santos. - 2016.
31 f.: il.

Orientador: Aivaldo Henrique da Fonseca.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2016.

1. Anaplasmosse. 2. Bovino. 3. MSP1a. 4. Rhipicephalus (Boophilus) microplus. 5. AmRio1. I.

Fonseca, Aivaldo Henrique da, 1953-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias III. Título.

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

PRISCILLA NUNES DOS SANTOS

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/02/2016

**Adivaldo Henrique da Fonseca (Ph.D) UFRRJ
(Orientador)**

Natalie Costa da Cunha (Ph.D) UFF

Daniel da Silva Guedes Junior (Ph.D) FIOCRUZ

Disse a flor para o pequeno príncipe: é preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas. (Antoine de Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força para superar todas as adversidades, ter colocado boas pessoas no meu caminho e ter me dado cada vez mais vontade de viver e crescer.

Aos meus pais Adriana Nunes dos Santos e Marcos Cesar dos Santos, meu irmão Marcos Cesar Nunes, minhas avós Noêmia Maria dos Santos e Ilda Nunes e todos os parentes pelo amor e apoio e carinho.

Ao meu namorado Luís Carlos Leal, pelo amor, apoio, compreensão e força, e à sua família, que sempre me tratam com muito carinho.

Aos amigos do ensino médio Arielle Jayme, Camila Igne e Queila Maria e Allan Apolinário e aos da graduação Marta Rafaela, Soraia John, Mariana Correia, Paloma Castro, Maria Eduarda, Estela Maia, Aline Craveiro, Carla Oliveira, Mariana Morena e Isis Araújo, pela amizade e apoio mesmo à distância.

Ao colega Gustavo Nunes pelo companheirismo e amizade durante toda minha trajetória no laboratório desde a graduação.

Ao professor Adivaldo Henrique da Fonseca, pela orientação, pelas palavras de incentivo e sua esposa, professora Marília Massard, pelo carinho e preocupação.

Aos colegas do laboratório Bruna Land, Carolina Marotta, Andrea Kill, Michele Bahia, Laura Ribeiro, Bruna Baêta, Juliana Ferreira, Adlilton Pacheco, Taís Carvalho, Max Andrade, Carla Carolina Uzedo, Márcio Barizon, Patrícia Barizon, Jéssica Rodrigues e Neide Gomes pela contribuição que cada um deu nas atividades, em orientações no cultivo, em pequenas ações ou palavras e pela amizade e boa convivência.

Ao colega Jenevaldo Barbosa da Silva pela paciência e disponibilidade em compartilhar todo o seu conhecimento a respeito do tema deste estudo, sendo de fundamental importância para o desenvolvimento do mesmo.

À colega Jaqueline Rodrigues por seu empenho nas atividades realizadas no estudo e seu companheirismo, além de ser de grande ajuda no processo de dissecação dos carrapatos.

Ao colega Paulo Cesar Magalhães por sua prestatividade na obtenção das fotos de microscopia e na coleta de carrapatos.

Ao colega Adrian Diaz pela ajuda, ensino e paciência no processamento das primeiras amostras.

Ao colega Matheus Dias Cordeiro por auxiliar na manutenção da colônia de carrapatos e dos bovinos e sugerir adequações em técnicas moleculares.

Ao professor Itabajara Vaz, por ceder os carrapatos da cepa Porto Alegre, utilizados no estudo.

Ao tratador Adenir Alves por auxiliar na rotina de manutenção dos animais e por sua preocupação quanto ao bem-estar dos mesmos.

Ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, pelo apoio fornecido para a realização do projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

BIOGRAFIA

Priscilla Nunes dos Santos, filha de Adriana Nunes dos Santos e Marcos Cesar dos Santos, nascida em 27 de julho de 1990, no município do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro.

Cursou todo o ensino médio no CIEP 362 Roberto Burle Marx. No ano de 2009 ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), diplomando-se em março de 2014.

Durante a graduação foi estagiária do Laboratório de Bacteriologia, do Departamento de Microbiologia e Imunologia veterinária durante o ano de 2010, e do Hospital Veterinário de Pequenos Animais nas áreas de Dermatologia e Clínica Geral durante o ano de 2011, ambos os estágios na instituição UFRRJ. Estagiou na Secretaria Especial de Promoção e Defesa dos Animais (SEPDA) no ano de 2012. Atuou como monitora da disciplina de Química Fisiológica, na UFRRJ do ano de 2011 ao ano de 2012. E foi aluna bolsista de Iniciação Científica (PIBIC) no Laboratório de Doenças Parasitárias do ano de 2012 ao ano de 2014.

Em 2014 foi aprovada no Processo de Seleção de mestrado para o Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, do Instituto de Veterinária desta Instituição, sob orientação do Professor Adivaldo Henrique da Fonseca. Foi bolsista de Pós-graduação do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de março de 2014 a março de 2016.

RESUMO

A anaplasmosse bovina, causada pela rickettsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale* (ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae), é uma doença economicamente importante de bovinos e é endêmica em regiões tropicais e subtropicais do mundo. As proteínas principais de superfície (MSPs) têm sido muito utilizadas em estudos envolvendo *A. marginale*, sendo MSP1a uma das mais estudadas, pois esta é uma adesina de eritrócitos bovinos e células de carrapato, possuindo assim um papel importante no fenótipo de transmissão do agente. Ao mesmo tempo, é considerada um marcador estável para cepas de *A. marginale*, uma vez que possui uma região C-terminal altamente conservada e uma região N-terminal, altamente variável, porém, constante para cepas. Acredita-se que esta proteína pode sofrer pressão seletiva pois possui um epítipo sensível à neutralização em sua região variável. Assim, em alterações casuais da estrutura das sequências repetidas devido à mutação, cepas bem adaptadas poderiam prevalecer no ambiente. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade do gene *msp1 α* de *A. marginale* na infecção aguda e crônica em um bezerro imunocompetente experimentalmente infectado e em carrapatos. No estudo, foi utilizado um bezerro, que foi infectado experimentalmente com a cepa AmRio 1 de *A. marginale* por via endovenosa. Este bezerro foi acompanhado através da observação de sinais clínicos, temperatura retal, esfregaços sanguíneos e hematócrito do dia 2 após infecção experimental até o dia 28 após infecção. O bovino posteriormente foi infestado com 1g de larvas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. O sangue do bezerro foi colhido entre o dia 2 ao dia 119 pós infecção. Os carrapatos foram recuperados na fase de partenógina (n=61) sendo 43 submetidos à dissecação para remoção de intestino e glândula salivar, e 18 para a coleta de saliva utilizando pilocarpina 2%. As amostras foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), possuindo como gene alvo *msp1 α*. O produto desta reação foi enviado para sequenciamento em ambas as direções. Após a inoculação da cepa AmRio 1 de *A. marginale*, o bovino apresentou sinais clínicos e alterações em hematócrito e temperatura, havendo necessidade de tratamento de suporte para a recuperação do animal. Isto demonstra a patogenicidade da cepa. Todas as amostras do bezerro e dos carrapatos foram positivas na PCR. As sequências revelaram uma estabilidade nas sequências repetidas de MSP1a, tanto na infecção aguda quanto na crônica no bezerro e em todos os órgãos e salivas de carrapato. A positividade das salivas de carrapato sugere que a cepa AmRio 1 de *A. marginale* é transmitida biologicamente por *R. (Boophilus) microplus*. Além disto, nos órgãos de carrapato havia grandes quantidades de DNA de *A. marginale*, indicando a replicação do agente.

Palavras-chave: Anaplasmosse; AmRio 1; MSP1a; Bovino; *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

ABSTRACT

Bovine anaplasmosis, caused by intraerythrocytic rickettsia *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae), is an economically important disease of cattle which is endemic in tropical and subtropical regions of the world. Major surface proteins (MSP) have been widely used in studies involving *A. marginale*, MSP1a being one of the most studied because it is an adhesin for bovine erythrocytes and tick cells, thus having an important role in the agent's transmission phenotype. At the same time, it is regarded as a stable marker for strains of *A. marginale*, since it has a highly conserved C-terminal region and a highly variable N-terminal region, but constant for strains. It is believed that this protein can undergo selective pressure because it has a neutralization-sensitive epitope in its variable region. Therefore, in random changes in the structure of tandem repeats due to mutation, well-adapted strains could prevail in the environment. Thus, the aim of this study was to evaluate the diversity of *msp1* α gene of *A. marginale* in acute and chronic infection in one experimentally infected immunocompetent calf and in ticks. In the study, a calf, which was experimentally infected intravenously with AmRio 1 strain of *A. marginale*, was used. This calf was monitored by observing clinical signs, rectal temperature, blood smears and hematocrit of day-2 after experimental infection until the day 28 after infection. The bovine was subsequently infested with 1g of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. The calf's blood was collected from day 2 to day 119 after infection. Ticks were recovered in partenogenetic phase (n=61) and 43 underwent dissection to remove the gut and salivary gland, and 18 for saliva collection using pilocarpine 2%. The samples were submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR), having *msp1* α as target gene. The product of this reaction was submitted for sequencing in both directions. After inoculation of the strain AmRio 1 of *A. marginale*, the bovine showed clinical signs and changes in hematocrit and temperature, with supportive treatment necessary for the animal's recovery. This demonstrates the pathogenicity of the strain. All samples of the calf and the ticks were positive in PCR. The sequences revealed a stability in repeated sequences of MSP1a in both acute and chronic infection in the calf and all tick organs and saliva. Positivity of tick saliva suggests that the strain AmRio 1 of *A. marginale* is transmitted biologically by *R. (Boophilus) microplus*. In addition, tick organs had large amounts of DNA of *A. marginale*, indicating the agent's replication.

Keywords: Anaplasmosis; AmRio 1; MSP1a; Bovine; *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Diluições do DNA extraído das amostras de sangue do bovino e órgãos de carrapato..... 14
- Tabela 2.** Temperatura, número de parasitos por campo em esfregaço e hematócrito do bezerro nos dias após inoculação da cepa AmRio 1 de *A. marginale*. Os parâmetros que contém traço não foram avaliados. 17
- Tabela 3.** Pools de órgãos e saliva de carrapatos organizados por faixa de peso..... 17
- Tabela 4.** Aminoácidos das sequências repetidas da MSP1a da cepa AmRio 1 de *Anaplasma marginale* e sua classificação segundo de la Fuente et al. (2007)..... 19

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Laboratório de Doenças Parasitárias..... 9
- Figura 2.** Inóculo de *A. marginale* em esfregaço de citocentrífuga corado em Giemsa 10%. São observadas colônias intracelulares de *A. marginale* em células de *Ixodes escapularis* (IDE8) (setas) 9
- Figura 3.** Dissecção do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizando o método de esgotamento (ANGELO, I.C. 2011). **A-** Corte do gnatossoma do carrapato utilizando tesoura oftálmica; **B-** Pressão sobre a carapaça do carrapato visando esgotamento dos órgãos; **C-** Cutícula esgotada e separação dos órgãos; **D-** Intestino do carrapato separado dos demais órgãos..... 12
- Figura 4.** Coleta de saliva do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alimentados em bezerro experimentalmente infectado utilizando tubo de microhematócrito graduado, após a aplicação da Pilocarpina 2%..... 12
- Figura 5.** Esfregaço de sangue do bezerro em pico de parasitemia. São observados eritrócitos contendo mais de um corpúsculo em seu interior (seta azul) e corpúsculos extraeritrocíticos (seta vermelha)..... 15
- Figura 6.** Alteração em coloração de mucosas (mucosas pálidas) no dia 12 após infecção experimental do bezerro..... 16
- Figura 7.** Fotografia de gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Os produtos de PCR são oriundos de uma reação de semi-nested segundo protocolo de Lew et al., (2002) que tem como alvo o gene *msp1* α . 1- Ladder 100 bp; 2- controle positivo (DNA da cepa AmRio 1 de *A. marginale* em cultivo celular); 3- Sangue do bezerro no dia do pico de parasitemia (dia 9 após inoculação); 4- Sangue do bezerro dias após pico de parasitemia (dia 13 após inoculação); 5- Sangue do bezerro 3 meses após o pico de parasitemia (infecção crônica); 6- Controle Negativo (água ultrapura estéril); 7- Pool de intestinos de carrapato; 8- Pool de glândulas salivares de carrapatos; 9- Pool de glândulas salivares de carrapatos; 10- Pool de saliva de carrapatos; 11- Pool de intestinos de carrapato; 12- Pool de intestinos de carrapatos; 13- Pool de glândulas salivares de carrapatos; 14- Pool de glândulas salivares de carrapatos 15- controle negativo (água ultrapura estéril)..... 18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Anaplasma marginale</i>	3
2.1.1 Taxonomia.....	3
2.1.2 Distribuição.....	3
2.1.3 Transmissão.....	3
2.1.4 Ciclo de vida de <i>Anaplasma marginale</i>	4
2.2 Proteína MSP1a.....	5
2.3 Cepa AmRio 1 de <i>Anaplasma marginale</i>	6
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1 Delineamento experimental.....	8
3.2 Cultivo in vitro de <i>Anaplasma marginale</i> e inoculação no animal.....	8
3.3 Reação em Cadeia da Polimerase.....	10
3.4 Acompanhamento da infecção por <i>Anaplasma marginale</i> e obtenção das amostras no bovino.....	10
3.5 Origem dos carrapatos e Infestação do animal.....	11
3.6 Obtenção das amostras oriundas de carrapato.....	11
3.7 Extração de DNA	13
3.8 Avaliação da diversidade genética de <i>Anaplasma marginale</i> no bovino	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 Parâmetros clínicos da infecção por AmRio1.....	15
4.2 Recuperação dos carrapatos e obtenção das amostras	17
4.3 Análise da diversidade do gene <i>mSP1</i> α	18
5 CONCLUSÕES.....	21
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

1. INTRODUÇÃO

A anaplasmoze bovina, causada pela rickettsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale* (ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae), é uma doença economicamente importante de bovinos e é endêmica em regiões tropicais e subtropicais do mundo (KOCAN et al., 2003, 2004). Este patógeno pode ser transmitido biologicamente por carrapatos, mecanicamente por fômites ou aparelho bucal de dípteros hematófagos (KOCAN et al., 2003, 2004), e, menos comumente, por transmissão transplacentária de vacas aos bezerros (AUBRY et al., 1986). Os prejuízos econômicos provocados pelo agente, ocorrem devido à perda de peso, anemia severa, abortamentos e morte dos animais infectados (BARBET et al., 1999).

Anaplasma marginale foi descrito a primeira vez na África do Sul, como “pontos marginais” em eritrócitos (Theiler, 1910). O período de incubação da anaplasmoze pode ser 7 a 60 dias, com uma média de 28 dias. Depois que a infecção intraeritrocítica se inicia, o número de eritrócitos parasitados aumenta geometricamente (KOCAN et al., 2010). Dentro destas células os corpúsculos de inclusão ligados à membrana contêm de 4-8 rickettsias, e na infecção aguda 70% dos eritrócitos ou mais podem se tornar infectados. A remoção de eritrócitos pelo sistema retículo endotelial resulta em anemia de leve a severa e icterícia (RICHEY., 1981).

Os sinais clínicos da doença podem incluir febre, perda de peso, abortamento, letargia, icterícia, e frequentemente morte em animais com mais de 2 anos de idade (RISTIC., 1977). Bovinos que sobrevivem à infecção aguda por *A. marginale*, desenvolvem a infecção persistente, caracterizada por baixa ricketsemia atingindo no máximo 10^6 eritrócitos infectados por mL (FRENCH et al., 1998, 1999; KIESER et al., 1990). Bovinos persistentemente infectados ou “portadores” possuem uma imunidade de longo prazo, e uma vez expostos, não desenvolvem doença clínica. Porém, estes animais se tornam uma fonte de infecção da rickettsia para os vetores da doença (RISTIC., 1960; ERIKS et al., 1989).

Anaplasma marginale é distribuído mundialmente em regiões tropicais e subtropicais do Novo mundo, Europa, África, Ásia e Austrália (KOCAN et al., 2004). Muitos isolados geográficos de *A. marginale* foram identificados na América do Norte e Sul, e diferem em morfologia, sequência proteica, características antigênicas e sua habilidade de transmissão por carrapatos (SMITH et al., 1986; WICKWIRE et al., 1987; ALLRED et al., 1990; RODRIGUEZ et al. 2000; DE LA FUENTE et al., 2001a, c, 2003a; PALMER, et al., 2001).

Seis Proteínas Principais de Superfície (MSPs) foram descritas em *A. marginale* oriundos de eritrócitos bovinos e mantidos em cultivo celular (KOCAN, et al., 2000). Três destas MSPs, MSP1a, MSP4 e MSP5, são codificadas por um único gene, e não variam antigenicamente durante a multiplicação da bactéria (BARBET et al., 1987; ALLRED et al., 1990; BOWIE et al., 2002), enquanto as outras três, MSP1b, MSP2 e MSP3, são de famílias multigênicas, e podem variar antigenicamente, mais notavelmente em infecções persistentes em bovinos (FRENCH et al., 1998; FRENCH, BROWN ; PALMER, 1999; BARBET et al., 2000, 2001; BRAYTON et al., 2001, 2002; MEEUS ; BARBET, 2001; BOWIE et al., 2002).

MSP1 é um heterodímero composto por duas estruturas não relacionadas de polipeptídeos denominados MSP1a e MSP1b. A estrutura da proteína MSP1a é formada por uma região conservada, na porção C-terminal e uma região variável, na porção N-terminal da proteína MSP1a onde ocorrem as sequências repetidas (ALLRED et al., 1990; DE LA FUENTE et al., 2005, 2007). MSP1a é uma proteína codificada pelo gene *msp1 a* (ALLRED et al., 1990) e está relacionada com a adesão à eritrócitos bovinos e células de carrapato (DE LA FUENTE et al., 2001 a, b; MCGAREY; ALLRED, 1994).

Devido à variação da porção variável de *msp1* α , este gene tem sido utilizado como um marcador genético estável para a identificação de isolados de *A. marginale* (BARBET et al. 1987, 1999; DE LA FUENTE et al., 2001c, 2001d). Além disto, MSP1a possui um epítipo sensível à neutralização (PALMER et al. 1987), sendo assim um candidato à antígeno vacinal. Na região variável da MSP1a, o códon da posição 10 da sequência repetida 4 é o que apresenta maior diversidade sob pressão negativa (SILVA et al., 2015a). Esta posição de aminoácido está presente em um epítipo imunodominante de células B para *A. marginale* (GARCIA-GARCIA et al., 2004). Isto sugere que esta sequência repetida pode estar sob pressão seletiva do sistema imune do hospedeiro, sobretudo em animais com infecção persistente (SILVA et al., 2015a).

A cepa AmRio 1 de *A. marginale*, isolada de um bezerro com infecção persistente no estado do Rio de Janeiro, pertence ao genótipo E, e possui em suas sequências repetidas da proteína MSP1a os polipeptídeos 162-F-17-F-F (BAÊTA et al., 2015). O genótipo E é o mais prevalente no Brasil, sendo considerado bem adaptado pela sua dominância no sudeste brasileiro (SILVA et al., 2015b). Porém, embora isolada e cultivada, ainda não foram realizados trabalhos observando fatores como transmissão vetorial e patogenicidade em bovinos da cepa AmRio1 de *A. marginale*.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a patogenicidade da cepa AmRio 1, a capacidade infectante de AmRio 1 de *A. marginale* a carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, e a diversidade genética da MSP1a da cepa AmRio1 de *A. marginale* na infecção aguda e crônica em um bezerro e em carrapatos *R. (B.) microplus* experimentalmente infectados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Anaplasma marginale*

2.1.1 Taxonomia

Anaplasma marginale é classificado dentro da ordem Rickettsiales que recentemente foi reorganizada em duas famílias, Anaplasmataceae and Rickettsiaceae, baseada na análise genética de 16S rRNA, groELS e genes de proteínas de superfície (DUMLER et al., 2001). Organismos da família Anaplasmataceae são organismos intracelulares obrigatórios que são encontrados exclusivamente ligados a membrana dentro de vacúolos no citoplasma da célula hospedeira (KOCAN et al., 2004). Dentro da família Anaplasmataceae, a análise filogenética suporta a formação de quatro grupos genéticos de organismos: *Anaplasma* com 96,1% de similaridade; *Ehrlichia* com 97,7 de similaridade; *Wolbachia* com um mínimo de 95,6% de similaridade; e *Neorickettsia* com um mínimo de 94,9% de similaridade (DUMLER et al., 2001). O gênero *Anaplasma* atualmente inclui *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis*, *A. bovis*, *A. phagocytophilum* e *A. platys* (DUMLER et al., 2001).

2.1.2 Distribuição

A anaplasmoose bovina ocorre em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo, e é o maior obstáculo na pecuária em muitos países (KOCAN et al., 2010). É endêmica no México, América Central, Ilhas Caribenhas, Ásia, África (KOCAN et al., 2010) e em todos os países da América do Sul, com exceção das áreas montanhosas e desérticas, como os Andes (GUGLIELMONE, 1995). Na Europa, está presente principalmente nos países mediterrâneos, e inclui infecções em animais selvagens (DE LA FUENTE et al., 2005).

Anaplasma marginale é enzoótico em todo o Brasil (ARAÚJO et al., 2003). Estudos epidemiológicos mostram uma soroprevalência de 16,3% no semi-árido Sergipano (OLIVEIRA et al., 2002), de 74,5% no estado do Pará (SILVA et al, 2014a), 98,6% no estado de Rondônia (BRITO et al., 2010), 92,44% no estado do Acre (BRITO et al, 2010), próximo à 100% no estado do Rio de Janeiro (SOUZA et al, 2000; SILVA et al, 2015a), 97% na Região Semiárida da Bahia (BARROS et al, 2005), e de 58,74% a 92,94% no estado do Paraná (MARANA et al., 2009; ANDRADE et al., 2001). Assim, a maior parte do território brasileiro encontra-se em estabilidade enzoótica, segundo critérios estabelecidos para o sistema *Rhipicephalus microplus-Babesia bovis* na Austrália (MAHONEY e ROSS, 1972). Porém, a estabilidade e instabilidade enzoótica depende de muitos fatores que vão além da avaliação da prevalência sorológica de *A. marginale*, como a taxa de infestação por carrapatos e identificação das cepas/genótipos de *A. marginale* (SILVA et al., 2015a).

2.1.3 Transmissão

A transmissão mecânica de *A. marginale* pode ser efetuada quando sangue infectado é transferido à bovinos suscetíveis via fômites ou aparelho bucal de carrapatos e de insetos picadores (EWING, 1981; KOCAN et al., 2003, 2004) como dípteros picadores do gênero *Tabanus*, *Stomoxys*, e várias espécies de mosquito (POTGIETER, 1979; EWING, 1981; FOIL, 1989). Frequentemente esta transmissão ocorre via fômites contaminados, incluindo agulhas, instrumentos de descorna e de contenção, tatuagem e castração, e brincos de identificação (KOCAN et al., 2010).

A transmissão biológica de *A. marginale* é realizada por carrapatos, e aproximadamente 20 espécies são consideradas vetores mundialmente (DIKMANS, 1950; EWING, 1981). No geral, carrapatos vetores de *A. marginale* incluem *Boophilus* spp, alguns

Dermacentor spp, *Ixodes ricinus* e *Rhipicephalus* spp, enquanto *Amblyomma* spp. não é considerado um transmissor do agente. Scoles et al. (2005) documentaram que a transmissão biológica por carrapatos foi mais eficiente que a transmissão mecânica por *Stomoxys calcitrans*, a mosca dos estábulos. A transmissão entre carrapatos pode ser transestadial (entre estágios evolutivos) ou intraestadial (dentro de um estágio evolutivo) (KOCAN et al., 1992 a, b), enquanto a transmissão transovariana de uma geração de carrapatos para a próxima não foi comprovada (STICH et al., 1989). Carrapatos machos podem ser um importante mecanismo de transmissão de *A. marginale* em carrapatos de um único hospedeiro, como o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus)* spp. e *D. albipictus*, pois podem se deslocar de um hospedeiro a outro, transmitindo o agente (KOCAN et al., 1992 a, b). Carrapatos machos infectados funcionam como um reservatório de *A. marginale*, contribuindo desta forma para a infecção persistente de bovinos (GE et al., 1996; KOCAN et al., 1992 a, b, 2000; PALMER et al., 2001).

A transmissão transplacentária de *A. marginale* pode ocorrer quando vacas desenvolvem anaplasmose aguda durante a gestação (ZAUGG; KUTTLER, 1984) ou condições de constantes reinfecções em áreas endêmicas (POTGIETER; VANRENSBURG, 1987). Silva et al. (2014b) relataram um alto número de animais infectados ainda no interior do útero. A raça, a densidade de animais no rebanho e infestação por carrapatos são fatores de risco para a prevalência da transmissão transplacentária (SILVA et al., 2014b). Silva, et al. (2015a) avaliaram animais nascidos infectados em um rebanho do Rio de Janeiro e encontraram as sequências repetidas 4–63–27, 78–24²–25–31 e τ –10²–15 da proteína MSP1a. Entre 19 sequências repetidas de MSP1a circulantes, somente estas três foram observadas relacionadas à transmissão transplacentária, sendo detectadas por Silva et al. (2015a) em 17,6% dos animais, enquanto Silvestre et al. (2016) obtiveram 10% de bovinos nascidos positivos para *A. marginale*. Achados semelhantes foram encontrados por Potgieter e Van Rensburg. (1987) e Grau et al. (2013) com taxas de incidência de 15,6% e 10,5% respectivamente, sem sinais clínicos. Isto sugere que a este tipo de transmissão pode ter uma importância maior do que se supõe até hoje em áreas endêmicas (SILVA et al., 2015a). A transmissão vertical é considerada um fenômeno importante que contribui para a persistência de várias cepas de *A. marginale* dentro de um mesmo rebanho (POHL et al., 2013).

2.1.4 Ciclo de vida de *Anaplasma marginale*

Eritrócitos infectados contendo os corpúsculos densos, são ingeridos pelo carrapato, funcionando como uma fonte de infecção para as células intestinais do vetor biológico (KOCAN et al., 2010). Depois do desenvolvimento de *A. marginale* nas células intestinais do carrapato, muitos outros tecidos se tornam infectados, incluindo glândulas salivares, de onde a rickettsia será transmitida aos vertebrados durante a alimentação (KOCAN et al., 1986, 1992 a, b; GE et al. 1996).

A cada sítio de infecção em carrapatos, *A. marginale* se desenvolve dentro de vacúolos ligados à membrana denominados colônias. A primeira forma de *A. marginale* vista dentro da colônia é a forma reticulada (vegetativa) que se divide por fissão binária formando grandes colônias que podem conter milhares de organismos. A forma reticulada pode mudar para a forma densa, que é a forma infectante e que sobrevive fora das células (KOCAN et al., 2010).

Bovinos se tornam infectados quando a forma densa de *A. marginale* é transmitida durante a alimentação do carrapato, via saliva. Eritrócitos são o único sítio de replicação de *A. marginale* em bovinos (KOCAN et al., 2010). *A. marginale* dentro de eritrócitos bovinos, forma inclusões ligadas à membrana (corpúsculo iniciais), que contém de 4 a 8 rickettsias, e durante a infecção aguda 70% ou mais das células podem ser parasitadas (RISTIC, 1977; RICHEY, 1981). O período de incubação varia de 7 a 60 dias, com média de 28 dias. Após o

número de eritrócitos infectados crescer geometricamente, estes são fagocitados por células reticuloendoteliais, resultando em anemia de branda a severa e icterícia sem hemoglobinemia ou hemoglobinúria (KOCAN et al., 2010).

2.2 Proteína MSP1a

Anaplasma marginale possui mais de 20 proteínas que induzem imunidade protetora, sendo algumas capazes de realizar variação em sua estrutura molecular (KOCAN et al., 2010). Foram relatadas seis Proteínas Principais de Superfície em *A. marginale* infectando eritrócitos bovinos e células de carrapato. Três destas MSPs, nomeadas MSP1a, MSP4 e MSP5, são codificadas por um único gene, e não variam antigenicamente durante a multiplicação da bactéria, enquanto as outras três, MSP1b, MSP2 e MSP3, são de famílias multigênicas, e podem variar antigenicamente (KOCAN et al., 2003a).

As proteínas de superfície MSP2 e MSP3 são imunodominantes e tem uma capacidade de variação que resulta na evasão do sistema imune do hospedeiro (MEEUS et al., 2003; FRENCH et al., 1999; BROWN et al., 2003).

Enquanto que se acredita que a função biológica de MSP4 esteja relacionada à interação patógeno-hospedeiro. Esta MSP é considerada um marcador filogeográfico de cepas de *A. marginale* (DE LA FUENTE et al., 2003 b, c).

MSP5 é uma proteína altamente conservada entre cepas de *Anaplasma marginale* e é amplamente utilizada em testes diagnósticos (NDUNG'U et al., 1995; TEBELE et al., 1991; VISSER et al., 1992).

MSP1 é um heterodímero composto por duas estruturas não relacionadas ligadas de forma não covalente denominadas MSP1a e MSP1b (BARBET; ALLRED, 1991). MSP1b é codificada por uma família mutagênica composta por dois genes (*mSP1b1* e *mSP1b2*) e três genes (*mSP1b1pg*, *mSP1b2pg* e *mSP1b3pq*) que se recombina, aumentando a diversidade genética (BARBET; ALLRED, 1991) e está relacionada à adesão à eritrócitos bovinos (DE LA FUENTE et al., 2001e).

A proteína MSP1a possui região C-terminal conservada e a região N-terminal variável, onde ocorrem as sequências repetidas (ALLRED et al., 1990). Há variações tanto no número de repetições quanto na presença de diferentes peptídeos que podem compor estas sequencias repetidas entre os aminoácidos 28 ou 29 (ALLRED et al. 1990; DE LA FUENTE et al., 2001c, d, 2002, 2003 a, b, c). Sendo a porção variável da proteína constante para cada cepa (DE LA FUENTE et al., 2003a). Desta forma, é utilizada para a classificação de cepas de *A. marginale* (DE LA FUENTE et al., 2001a). Esta proteína está envolvida na adesão de *A. marginale* a eritrócitos bovinos e células de carrapato e, portanto, é um determinante da infecção para bovinos e transmissão de *A. marginale* por carrapatos (CABEZAS-CRUZ et al., 2013). Se observou que MSP1a está relacionada a interações entre parasitos, hospedeiros vertebrados e invertebrados (DE LA FUENTE et al., 2001c, 2003a, 2005; KOCAN et al., 2003, 2004; BRAYTON et al., 2005). A MSP1a possui epítomos sensíveis à neutralização por célula B que são conservados entre cepas heterólogas de *A. marginale* (PALMER et al., 1987; OBERLE et al., 1988).

Em todo o mundo, 131 cepas de *A. marginale* e 79 sequências repetidas de MSP1a foram caracterizadas (DE LA FUENTE et al., 2007). Estes resultados confirmam a heterogeneidade genética das cepas de *A. marginale* em áreas endêmicas em todo o mundo (KOCAN et al., 2010). Porém, a diversidade genética não resulta em evolução, a menos que uma variante com maior aptidão surja em condições que promovam o desequilíbrio e favoreçam a evolução aleatória rápida (DE LA FUENTE et al., 2001a). Assim, sequências do tipo selvagem ou sequência mestre, nessa situação permanecem inalteradas (DE LA FUENTE et al., 1999). No estudo de Silva et al. (2015a), foi concluído que pode ocorrer circulação de

várias sequências repetidas MSP1a de *A. marginale* em um mesmo animal, e estas ficam sob constante variação.

Nas sequências repetidas de MSP1a há aminoácidos carregados negativamente, o ácido aspártico e glutâmico, na posição 20, que são essenciais na ligação de MSP1a ao extrato celular de carrapato (CABEZAS-CRUZ et al., 2013). Isto sugere que a posição do aminoácido 20 é fundamental para a ligação de *A. marginale* a células de carrapato (CABEZAS-CRUZ et al., 2013). A análise das sequências repetidas de MSP1a contribui para o entendimento da diversidade genética de *A. marginale* dentro de regiões específicas, bem como oferecendo informações sobre a evolução da interação patógeno-hospedeiro (DE LA FUENTE et al., 2003a, 2004, 2007; ESTRADA-PEÑA et al., 2009). Análises utilizando genes conservados como o gene 16S fornecem informações de agentes que divergiram há tempos, oferecendo dados do “tronco” da árvore filogenética. MSP1a é um gene utilizado para classificação de cepas, definindo assim as “folhas” da árvore filogenética de *A. marginale* (DE LA FUENTE et al., 2001f).

Introduções de diferentes cepas em uma mesma região tem contribuído com a diversidade genética observada em *A. marginale* (KOCAN et al., 2010). Estudos anteriores mostram que, na América do Sul, as sequências repetidas da MSP1a mais frequentes são 4, 8, 16, 56, 60, 64, 67, α , β , γ , π e τ (ESTRADA-PEÑA et al., 2009). Na primeira repetição, as sequências repetidas mais frequentes descritas em cepas do Brasil foram 16, α e τ no Paraná (VIDOTTO et al., 2006), 72 e α em Minas Gerais (POHL et al., 2013), e 4 e τ no Rio de Janeiro (SILVA et al., 2015a). A análise das sequências microssatélites de MSP1a tem como resultado cinco (B, C, D, E e G) diferentes genótipos entre as cepas de *A. marginale* no Brasil, sendo o genótipo E o mais prevalente, e desta forma, considerado o mais bem adaptado e o mais competente para infectar hospedeiros (VIDOTTO et al., 2006; POHL et al., 2013; SILVA et al., 2015a).

Embora os genótipos B, C, D e G também tenham sido previamente detectados na Argentina e no Brasil (DE LA FUENTE et al., 2004; VIDOTTO et al., 2006; RUYBAL et al., 2009; POHL et al., 2013). O genótipo G é o mais encontrado mundialmente e tem sido considerado o tipo mais prevalente em ecoregiões da África do Sul, EUA e México (ESTRADA-PEÑA et al., 2009). A cepa α - β^3 - Γ foi a mais prevalente em um estudo realizado no estado de São Paulo (SILVA et al., 2015b). E foi identificada como uma cepa altamente transmissível, já que foi observada no Brasil, México, Argentina e Taiwan. A cepa 4-63-27 foi a mais prevalente no Rio de Janeiro (SILVA et al., 2015a).

2.3 Cepa AmRio 1 de *Anaplasma marginale*

A cepa AmRio 1 foi isolada por Baêta et al. (2015), a partir de amostras de sangue coletadas de um bovino naturalmente infectado com infecção persistente, oriundo de uma propriedade da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Esta cepa foi isolada e é mantida no Laboratório de Doenças Parasitárias em células embrionárias de *Ixodes escapularis* (IDE8) (MUNDERLOH et al., 1996) em meio Leibovitz L15B contendo 5% de soro fetal bovino inativado, NaHCO₃ (2.5g/L) e HEPES (MUNDERLOH et al., 1996).

A análise do microssatélite de *msp1* α da cepa AmRio 1 resultou no genótipo E, e a sequência repetida 162 foi reportada pela primeira vez (BAÊTA et al., 2015). A análise da estrutura das sequências repetidas da cepa AmRio 1 resultou nas repetições 162-F-17-F-F. Após seis passagens do agente em células IDE8, as sequências permaneceram as mesmas (BAÊTA et al., 2015).

A análise filogenética da cepa AmRio 1, indica que esta cepa pertence ao grupamento α , que possui cepas previamente descritas no Brasil e Argentina. Embora pertencente ao

grupamento α , AmRio 1 diverge das demais cepas do mesmo grupamento quando comparadas as sequências repetidas, já que as cepas possuem predominantemente repetições α , β e Γ (BAËTA et al., 2015). Isto sugere que é possível que a cepa AmRio 1 tenha um comportamento diferente no que se refere à transmissão de *A. marginale* quando comparada às outras cepas do mesmo grupamento, pois possui sequências repetidas totalmente diferentes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

No estudo, foi utilizado um bezerro com 20 dias de idade, oriundo do setor de bovinocultura de leite, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, após a ingestão do colostro, livre de patógenos, não-esplenectomizado. O bovino, da raça holandesa, foi mantido com alimentação baseada em 4 litros de leite administrados uma vez por dia, feno de alfafa, concentrado de farelo de trigo (Terneiras[®]) e água à vontade. Após 45 dias foi realizado o desmame do animal, sendo o mesmo mantido apenas com feno, concentrado e água. As instalações onde o bezerro se encontrava eram baias (4 x 4m), higienizadas diariamente e devidamente teladas. As baias foram tratadas previamente com o carrapaticida Amitraz 12,5% (Shering[®]-Plough Animal Health) no volume de 2,5 mL/m² diluído a 4mL/L durante 3 dias, e a vassoura de fogo 2 vezes por semana durante 4 semanas. O sangue do bovino foi submetido à Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para o gene *msp5* segundo protocolo de Singht et al. (2012) para verificar uma possível positividade para *A. marginale*. O diagnóstico negativo foi confirmado duas vezes: um e dois meses antes da inoculação.

A inoculação no bezerro foi feita a partir de células IDE8 (*Ixodes escapularis*) infectadas com a cepa AmRio 1 de *Anaplasma marginale*. Após a inoculação, observou-se o bovino clinicamente, realizou-se diariamente hematócritos, aferição da temperatura retal e a avaliação da parasitemia. O bezerro também foi infestado com larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e partenóginas foram recuperadas após a alimentação. A infestação foi realizada no dia 8 após inoculação do agente no bezerro. O presente estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso dos animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com o número de protocolo 2134171215.

3.2 Cultivo in vitro de *Anaplasma marginale* e inoculação no animal:

A cepa AmRio 1 de *A. marginale* utilizada para preparar o inóculo é atualmente cultivada no Laboratório de Doenças Parasitárias, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Figura 1). Esta cepa foi previamente isolada a partir de sangue de bovino infectado, por Baêta et al. (2015) e é mantida em cultivo de células embrionárias de carrapatos *Ixodes escapularis* (linhagem IDE8), em meio L15-B suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino, NaHCO₃(2.5 g/L) e HEPES (MUNDERLOH et al.,1996). A passagem do agente é realizada a cada trinta dias aproximadamente, e a renovação do meio é realizada duas vezes por semana.

O inóculo foi preparado a partir de um cultivo com percentual de infecção superior à 70%, avaliado em microscópio óptico (Olimpus BX41[®]100x) em esfregaços de citocentrífuga (Figura 2), que após confeccionados foram fixados em metanol durante três minutos e corados em Giemsa (Sigma Aldrich[®]) a 10% durante vinte e cinco minutos. Após a observação do esfregaço e confirmação do valor mínimo de infecção de 70%, os frascos sofreram rinsagem dentro do fluxo laminar utilizando-se pipeta pasteur estéril (Kasvi[®]) para o desprendimento da monocamada de células IDE8 infectadas na parede do frasco. Após isto, o meio contendo as células foi transferido para uma seringa contendo uma agulha curva, e utilizando-se esta agulha, o meio contendo as células foi desprezado num béquer estéril, de forma que ocorresse o rompimento de células infectadas que ainda estivessem íntegras. O meio contido no béquer foi transferido no volume de 1,5 mL para uma seringa de 3,0 mL com agulha para a realização da inoculação. A inoculação foi realizada por via endovenosa, sendo administrado pela veia jugular.



Figura 1. Laboratório de Doenças Parasitárias.

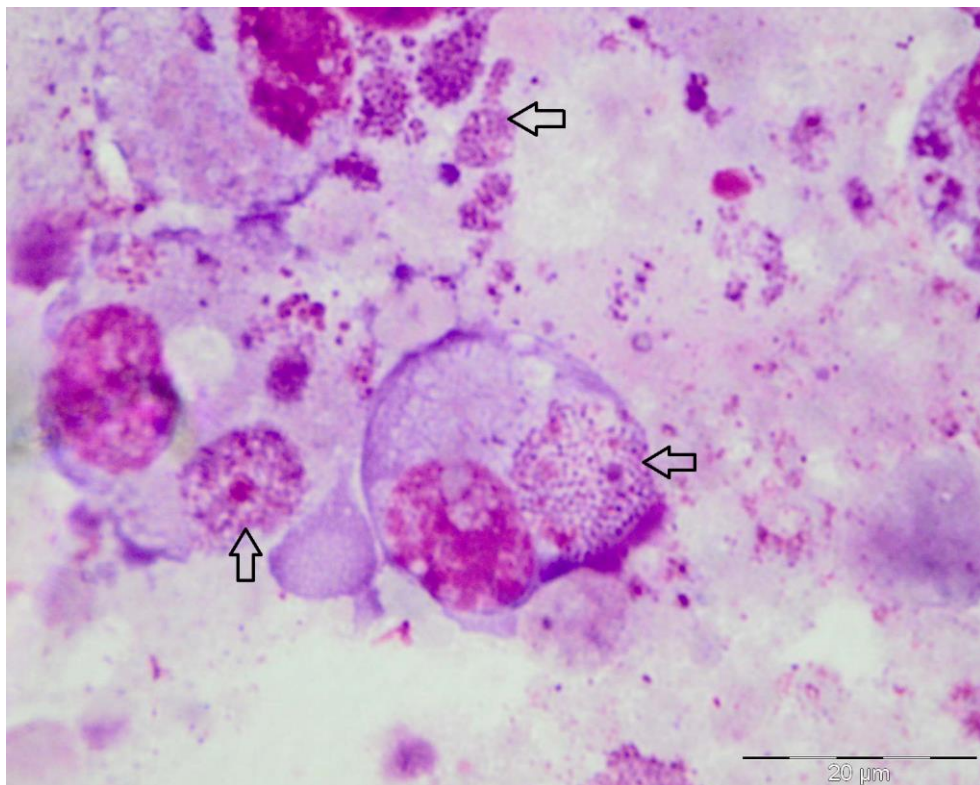


Figura 2. Inóculo de *A. marginale* em esfregaço de citocentrífuga corado em Giemsa 10%. São observadas colônias intracelulares em células de *Ixodes escapularis* (IDE8) (setas).

3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para msp5

A detecção do gene alvo que codifica a proteína MSP5 (458bp) foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias, na UFRRJ. Foi feita uma reação de seminested como triagem para detecção de *Anaplasma* spp. utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (Singh et al., 2012):

Amar msp5 eF: 5 GCA TAG CCT CCG CGT CTT TC 3

Amar msp5 eR: 5 TCC TCG CCT TGG CCC TCA GA 3

Amar msp5 iF: 5 TAC ACG TGC CCT ACC GAG TTA 3

A primeira reação foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores Amar msp5 eF e Amar msp5 eR. A desnaturação inicial foi a 94°C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, o anelamento foi a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos.

A segunda reação foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores Amar msp5 iF e Amar msp5 eR. A desnaturação inicial foi a 94°C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, o anelamento foi a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos.

Ambas as reações foram realizadas utilizando aparelho termociclador (Thermal Cycler Biorad T100®).

Em ambas as etapas o volume final de reação foi de 15 microlitros de mistura. A primeira reação continha 7,5 microlitros de Master Mix (Promega®, USA), 3,3 microlitros de água ultrapura estéril, 0,6 microlitro de cada oligonucleotídeo iniciador, Amar msp5 eF e Amar msp5 eR (ambos na concentração de 100 micromolar) e 3 microlitros de amostra de DNA. Enquanto segunda reação continha 7,5 microlitros de Master Mix (Promega®, USA), 5,3 microlitros de água ultrapura estéril, 0,6 microlitro de cada oligonucleotídeo iniciador, Amar msp5 eF e Amar msp5 iF (ambos na concentração de 100 micromolar) e 1 microlitro produto da primeira reação.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. O tempo de corrida foi de 90 minutos, 80 V e intensidade de 160 em aparelho de eletroforese (PowerPac™ Basic Power Supply, Biorad®).

A observação e fotografias do gel foram realizadas utilizando aparelho transiluminador (Transilluminator, Loccus Biotecnologia®) e equipamento de captura de imagem L-PIX STi (Loccus Biotecnologia®).

3.4 Acompanhamento da infecção por *Anaplasma marginale* e obtenção das amostras do bovino

A partir da infecção experimental do bezerro, o sangue do mesmo foi colhido nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 21, 28 e 90 após a infecção. Foram realizados também nestes dias hematócrito, esfregaço sanguíneo e aferição de temperatura retal do animal. Além disto, o animal foi acompanhado clinicamente para a observação de possíveis manifestações clínicas como palidez de mucosas, icterícia e prostração.

Os esfregaços sanguíneos foram confeccionados em lâminas de vidro, a partir uma gota de sangue utilizando uma lâmina extensora. Estes esfregaços foram fixados em metanol por 3 minutos e corados em Giemsa (Sigma Aldrich®) a 10%, durante 45 minutos, e foram visualizados em microscópio óptico (Olimpus BX41®) com objetiva de imersão de 100x. As células infectadas foram contadas em 20 campos aleatoriamente selecionados (250-300 células por campo), e o número de células positivas foi calculado em valores percentuais. O

animal foi considerado infectado a partir de um volume globular menor que 28% (DOUGLAS e WARDROP, 2010) e parasitemia igual ou superior a 0.01% (RIBEIRO e REIS, 1981).

O hematócrito foi feito utilizando tubos de microhematócrito, que foram preenchidos com sangue obtido a partir de coletas da veia jugular até 2/3 de seu comprimento, sua porção final foi fechada utilizando fogo, de uma lamparina. Estes tubos foram centrifugados em uma centrífuga de microhematócrito (Fanem[®], São Paulo). Foram feitos dois hematócritos a cada amostra de sangue, e foi calculado a partir do volume total de sangue, o percentual de células presentes, utilizando régua. O resultado final foi a média do valor dos dois hematócritos (DOUGLAS e WARDROP, 2010).

3.5 Origem dos carrapatos e Infestação do animal

Os carrapatos, cedidos pelo professor Itabajara Vaz, pertenciam a colônia da cepa de Porto Alegre, livre de patógenos, mantida em bezerros holandeses (*Bos taurus*) livres de carrapatos e patógenos (Reck et al, 2009). A colônia foi mantida em BOD à 27 graus, com 80% de umidade relativa do ar.

O animal foi infestado com aproximadamente 20.000 larvas de carrapatos (1g de ovos) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 15 dias após eclosão. O bovino foi infestado no dia 8 após a inoculação de *A. marginale*. Os carrapatos foram recuperados posteriormente, na fase de partenógina, para a extração de intestino, glândula salivar e saliva.

3.6 Obtenção das amostras oriundas de carrapato

Os 61 carrapatos recuperados na fase de partenógina foram submetidos a dissecação por esgotamento (ANGELO, I.C. 2011) para a remoção de intestino, glândula salivar e saliva (Figura 3). Estes carrapatos foram colocados em placas de petri limpas, contendo PBS Tween (fosfato salina, pH 7,4 e Tween 20 a 5%). Foi utilizada uma tesoura oftálmica para a secção da região do gnatosoma do carrapato, e posteriormente o mesmo foi submetido à uma pressão da região posterior para a anterior a fim de esgotar todo o conteúdo de dentro do carrapato para a região seccionada, e consequente esgotamento da cutícula.

Os órgãos após esgotamento foram lavados no PBS Tween contido na placa, e separados uns dos outros, para a remoção apenas do intestino e da glândula salivar. Após a separação, estes órgãos foram acondicionados em tubos de polipropileno contendo RNA later sendo organizados em pools de 5 órgãos para cada tubo, separando-se as glândulas salivares em um tubo e intestinos em outro. Foi realizada a reposição de um novo PBS Tween na placa a cada carrapato dissecado. A cada novo pool de carrapatos também foi realizada a higienização da placa e renovação do PBS Tween. No total, 33 partenóginas estavam na faixa de peso entre 100-200 miligramas e 28 carrapatos entre 200-300 miligramas.

Os carrapatos foram agrupados em pools de em média 5 carrapatos, resultando em 4 pools tanto para as faixas de peso entre 100-200 miligramas quanto para as de 200-300 miligramas que foram destinadas à dissecação, e três pools para coleta de saliva, sendo dois pools com peso entre 100-200 miligramas contendo 6 carrapatos em média, e somente um pool entre 200-300 miligramas contendo 5 carrapatos.

Dezoito carrapatos foram submetidos à aplicação de pilocarpina (pilocarpine hydrochloride powder – Sigma-Aldrich[®]) a 2% em PBS Tween abaixo do último par de patas, para a obtenção da saliva (Figura 4). A saliva foi extraída por um período de 2 horas após a aplicação da solução de acordo com o protocolo de Franco (2015). Os carrapatos foram mantidos colados em fitas dupla face e após a aplicação da pilocarpina, suas salivas foram colhidas utilizando tubos de microhematócrito. A saliva foi colhida em pools de 6 carrapatos em média e armazenadas em tubos de polipropileno resfriados em gelo, dentro de um isopor durante a coleta, e posteriormente foram acondicionados a -20°C.

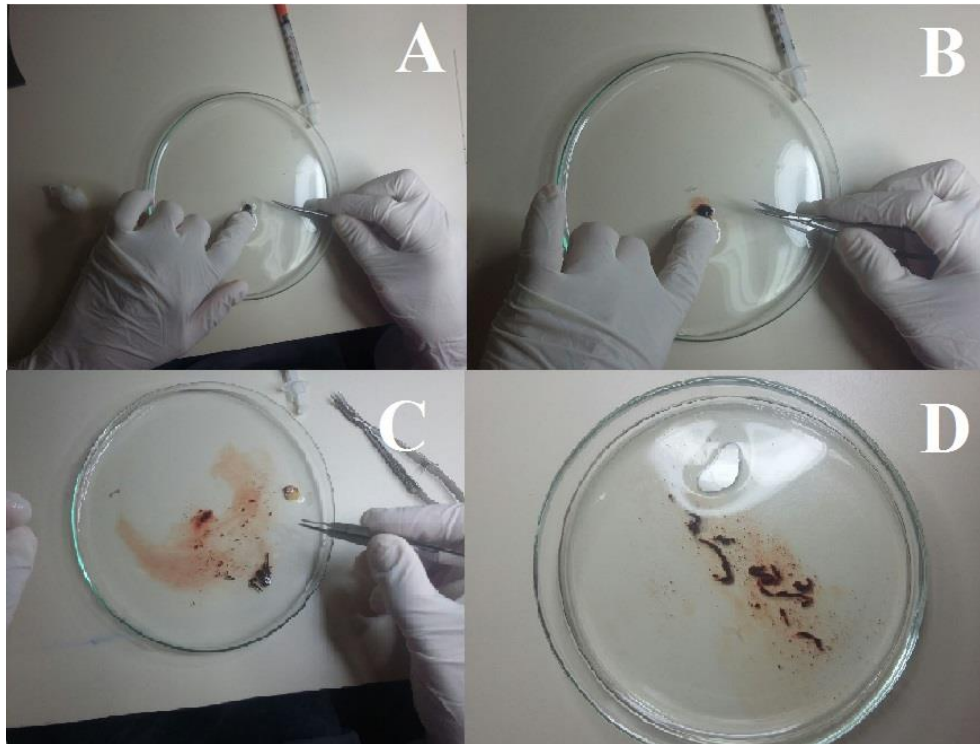


Figura 3. Dissecção do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizando o método de esgotamento (ANGELO, 2011). **A-** Corte do gnatossoma do carrapato utilizando tesoura oftálmica; **B-** Pressão sobre a cutícula do carrapato visando esgotamento dos órgãos; **C-** Cutícula esgotada e separação dos órgãos; **D-** Intestino do carrapato separado dos demais órgãos.



Figura 4. Coleta de saliva utilizando tubo de microhematócrito graduado, após a aplicação da Pilocarpina 2% em carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alimentados em bezerro experimentalmente infectado com *Anaplasma marginale*.

3.7 Extração de DNA

A extração do DNA das amostras foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias. O DNA do sangue bovino foi extraído a partir de 200 microlitros da amostra, que foi colhida nos dias após a inoculação do agente. A extração foi realizada utilizando o kit Qiagen Blood and Tissue (Qiagen®, Madison, WI, USA) conforme recomendação do fabricante.

As amostras de intestino e glândula salivar dos carrapatos separadas em pools, foram mantidas em RNA later a -20°C até o momento da extração. Para a realização da extração, as amostras foram submetidas a quatro centrifugações em PBS Tween a 16.000 xg com renovação do PBS Tween a cada centrifugação para a lavagem dos órgãos e remoção do RNA later. Após a lavagem, os órgãos foram triturados utilizando esferas ZY 2,0-2,5 mm (Netzsch®) em aparelho Mini-Beadbeater (Biospec®) imersos no primeiro tampão utilizado no kit Qiagen Blood and Tissue (Qiagen®, Madison, WI, USA) o tampão ATL, conforme volume indicado pelo fabricante. O DNA destas amostras foi extraído conforme protocolo indicado por fabricante para extração de DNA de tecidos.

As amostras de saliva, mesmo em pool, não atingiam o volume final de 200 microlitros, portanto foram preenchidas com aproximadamente 150 microlitros de PBS Tween até o volume de 200 microlitros para posteriormente serem submetidas à extração de DNA utilizando o mesmo protocolo utilizado para sangue, com o kit Qiagen Blood and Tissue (Qiagen®, Madison, WI, USA) segundo as recomendações do fabricante.

3.8 Avaliação da diversidade genética de *Anaplasma marginale* no bovino

A PCR para a análise da diversidade genética de *A. marginale* foi realizada no Laboratório de Doenças Parasitárias. O DNA obtido das amostras de sangue e carrapatos foi submetido à PCR, uma reação de semi-nested PCR, segundo protocolo de Lew et al (2002) para o gene *msp1 α*, que possui aproximadamente 1190 bp. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação foram:

1733F: 5'TGTGCTTATGGCAGACATTTCC3'
3134R: 5'TCACGGTCAAACCTTTGCTTACC3'
2957R: 5'AAACCTTGTAGCCCCAACTTATCC3'

A primeira reação foi executada com os oligonucleotídeos iniciadores 1733F e 3134R. A desnaturação foi feita a 94°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. A extensão final foi a 72°C por 2 minutos.

A segunda reação foi executada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 1733F e 2957R. A desnaturação foi feita a 94°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. A extensão final foi a 72°C por 2 minutos.

Ambas as reações foram realizadas utilizando aparelho termociclador (Thermal Cycler Biorad T100®).

Em ambas as etapas o volume final de reação foi de 25 microlitros de mistura. A primeira reação continha 12,5 microlitros de Master Mix (Promega®, USA), 6,5 microlitros de água ultrapura estéril, 0,5 microlitro de cada oligonucleotídeo iniciador 1733F e 3134R (ambos na concentração de 100 micromolar) e 5 microlitros de amostra de DNA. Enquanto segunda reação continha 12,5 microlitros de Master Mix (Promega®, USA), 10,5 microlitros de água ultrapura estéril, 0,5 microlitro de cada oligonucleotídeo iniciador 1733F e 2957R (ambos na concentração de 100 micromolar) e 1 microlitro produto da primeira reação. Porém, quando o protocolo passou

a ser feito apenas com a segunda reação, foram utilizadas quantidades idênticas de componentes da primeira reação para a mistura da segunda reação.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. O tempo de corrida foi de 90 minutos, 80 V e intensidade de 160 em aparelho de eletroforese (PowerPac™ Basic Power Supply, Biorad®).

A observação e fotografias do gel foram realizadas utilizando aparelho transiluminador (Transilluminator, Loccus Biotecnologia®) e equipamento de captura de imagem L-PIX STi (Loccus Biotecnologia®).

A grande quantidade de DNA presente nas amostras tanto de sangue quanto de carrapato fez com que a reação de semi-nested PCR para *mssl* α resultasse num gel com duas bandas. Assim, foi realizada uma modificação no protocolo original. Foi realizada apenas a segunda reação para a preparação dos produtos de PCR que seriam enviados para o sequenciamento. Ainda assim, para melhores resultados parte das amostras de DNA foram diluídas em concentrações de 1:10 e 1:1000 em água ultrapura estéril até que seus produtos se apresentassem com uma intensidade compatível para envio para sequenciamento.

Todas as amostras de DNA oriundas de pools de intestinos de carrapatos, do sangue do bezerro no pico parasitêmico e do sangue do bezerro 3 dias após o pico parasitêmico foram diluídas na proporção de 1:1000 (Tabela 1).

Todas as amostras de DNA oriundas de pools de glândulas salivares de carrapatos e a do sangue do bezerro na infecção crônica, foram diluídas na proporção de 1:10 (Tabela 1).

Tabela 1. Diluições do DNA extraído das amostras de sangue do bovino e órgãos de carrapato.

Amostras	Diluição
Pools de intestinos de carrapatos	1:1000
Pools de glândulas salivares	1:10
Sangue do bovino no pico de parasitemia	1:1000
Sangue do bovino 3 dias após o pico de parasitemia	1:1000
Sangue do bovino na infecção crônica	1:10

As salivas não foram diluídas, uma vez que durante a extração já haviam sido preenchidas para o volume de 200 microlitros utilizando PBS Tween. Posteriormente, as amostras foram submetidas à purificação utilizando o kit Purelink® PCR Purification (Thermo Fisher Scientific) no Laboratório de Doenças Parasitárias. O produto purificado foi enviado para sequenciamento nas direções 5'-3' e 3'-5', na Universidade do Estadual Paulista (UNESP), campus Jaboticabal.

As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa CAP 3 (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>) e foram traduzidas para aminoácidos utilizando o programa ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>) do instituto suíço de bioinformática.

As sequências foram analisadas utilizando o microssatélite 5' UTR, do gene *mssl* α , localizado entre a sequência Shine-Dalgarno (GTAGG) e a sequência do códon de iniciação (ATG) (ESTRADA-PEÑA et al., 2009). A estrutura do microssatélite 5' UTR é composta pela sequência Shine-Sargarno (GTAGG), m (GTTT), n (GT), T e ATG. A distância entre a sequência Shine-Dalgarno e o códon ATG foi calculada utilizando a fórmula $(4xm) + (2xn) + 1$. As sequências repetidas foram classificadas conforme a nomenclatura proposta por de la Fuente et al. (2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros clínicos da infecção por AmRio1

Foi observado um aumento quantitativo do número de corpúsculos de *A. marginale* ao longo do período após a infecção, acompanhado por aumento da temperatura, alcançando a hipertermia no dia 7, e queda do hematócrito (Tabela 2). O dia 9 após a inoculação foi considerado o pico de parasitemia, com 19% de eritrócitos infectados por campo (Figura 5), e sinais clínicos como palidez de mucosas e prostração. O quadro clínico do bezerro se agravou, principalmente no dia 12 após a inoculação, em que o hematócrito atingiu o valor de 14% (Figura 6). Neste dia foi feita uma transfusão sanguínea, com 450 mL de sangue para dar suporte a recuperação do animal, sendo repetida a transfusão no dia seguinte com mesmo volume de sangue, oriundo do mesmo doador, que apresentava hematócrito 29%, negativo para *A. marginale*. Não foi realizado tratamento medicamentoso.

A evolução do quadro clínico do bezerro mostra que a cepa AmRio 1 é patogênica, ocorrendo a anaplasmosse clínica em um curto período de tempo ocasionando anemia severa (Figura 6) podendo ser observada mucosas hipocoradas e sem intervenção de terapia de suporte, possivelmente o animal viria a óbito.

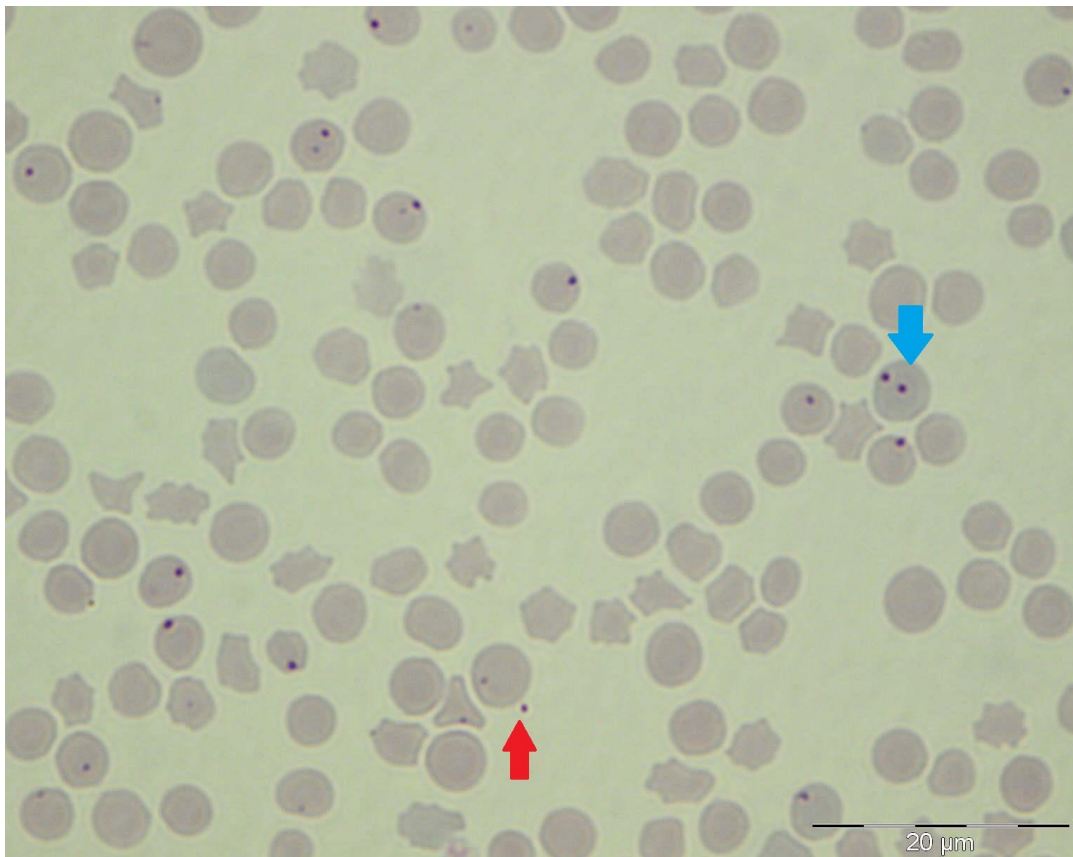


Figura 5. Esfregaço de sangue do bezerro infectado com a cepa AmRio1 de *Anaplasma marginale* durante o pico parasitêmico. São observados eritrócitos contendo mais de um corpúsculo em seu interior (seta azul) e corpúsculos extraeritrocíticos (seta vermelha).



Figura 6. Alteração em coloração de mucosas (mucosas pálidas) no 12º dia após a infecção experimental do bezerro com a cepa AmRio1 do *Anaplasma marginale*.

Tabela 2. Temperatura corpórea, número de parasitos por campo em esfregaço sanguíneo e hematócrito de bezerro nos dias após a inoculação da cepa AmRio 1 de *A. marginale*.

Dia	Temperatura	Esfregaço	Hematócrito
1	39°C	0,037%	-
4	38,9°C	0,04%	-
7	39,4°C	1,6%	-
8	40,2°C	3,7%	19
9 (pico de parasitema)	40,5°C	19%	19
10	40,7°C	-	16
11	40,9°C	17%	15
12 (transfusão)	40,7°C	0,37%	14
13 (transfusão)	40,3°C	-	16
14	39,3°C	-	16
15	39,0°C	-	-
17	39,0°C	-	20
21	38,9°C	-	22
28	38,5°C	0,04%	24

Os parâmetros que contém traço (-) não foram avaliados.

4.2 Recuperação dos carrapatos e obtenção das amostras

Entre os dias 43 e 45 após a inoculação da cepa AmRio1 de *A. marginale* no bezerro e 36 dias após infestação com *R. (B.) microplus*, os carrapatos foram recuperados. Este longo tempo para a recuperação pode ser explicado pelo o clima não favorável ao desenvolvimento dos carrapatos neste período. Foram obtidos quatro pools de glândulas salivares e intestinos carrapatos entre 100 e 200 microgramas e quatro pools entre 200 e 300 microgramas, com 5 carrapatos em média, por pool. Para a coleta de saliva obteve-se dois pools de carrapatos entre 100 e 200 microgramas e um pool entre 200 e 300 microgramas, cada pool com 6 carrapatos em média (Tabela 3).

Tabela 3. Pools de órgãos e saliva de carrapatos organizados por faixa de peso.

Faixa de peso	Número de pools de órgãos (dissecção)	Número de pools de saliva (coleta de saliva)	Número de carrapatos por pool (média)
100-200 miligramas	4	2	6
200-300 miligramas	4	1	6

4.3 Análise da diversidade do gene *msp1 α*

As amostras de sangue do bezerro após a infecção com a cepa AmRio1 de *A. marginale*, tanto na fase aguda quanto na fase crônica, os órgãos e saliva de todos os carrapatos *R. (B.) microplus*, em todas as faixas de peso, foram positivas na Semi-Nested-PCR para o gene *msp1α* do *A. marginale* (Figura 7). Isto mostra que a cepa AmRio 1 de *A. marginale* foi capaz não só de infectar o bezerro, mas também os carrapatos que se alimentaram durante a fase persistente da doença. Adicionalmente, a positividade observada na saliva do carrapato indica que esta cepa provavelmente seja transmitida biologicamente pelo carrapato *R. (B.) microplus*.

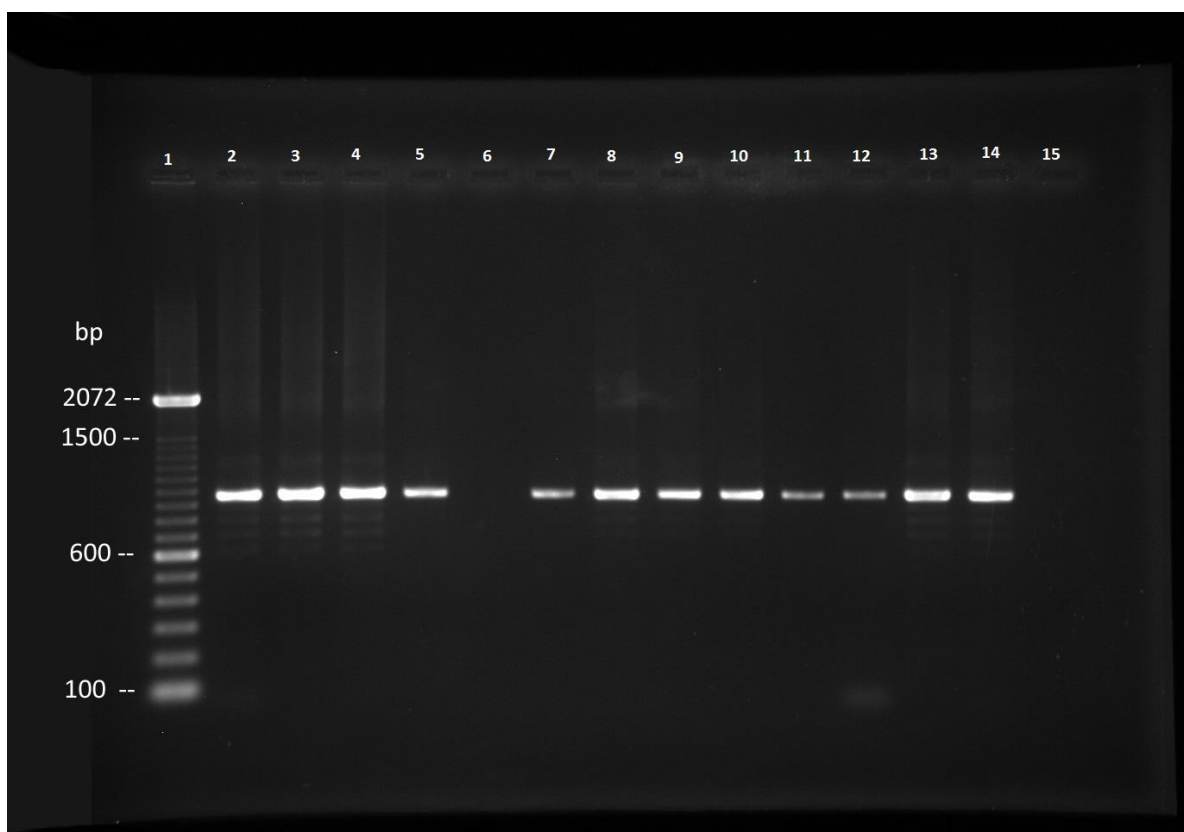


Figura 7. Fotografia de gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Os produtos de PCR são oriundos de uma reação de semi-nested segundo protocolo de Lew et al. (2002) que tem como alvo o gene *msp1 α*. 1- Ladder 100 bp; 2- controle positivo (DNA da cepa AmRio 1 de *A. marginale* em cultivo celular); 3- Sangue do bezerro no dia do pico de parasitemia (dia 9 após inoculação); 4- Sangue do bezerro dias após pico de parasitemia (dia 13 após inoculação); 5- Sangue do bezerro 3 meses após o pico de parasitemia (infecção crônica); 6- Controle Negativo interno (água ultrapura estéril); 7- Pool de intestinos de carrapato; 8- Pool de glândulas salivares de carrapatos; 9- Pool de glândulas salivares de carrapatos; 10- Pool de saliva de carrapatos; 11- Pool de intestinos de carrapato; 12- Pool de intestinos de carrapatos; 13- Pool de glândulas salivares de carrapatos; 14- Pool de glândulas salivares de carrapatos; 15- Controle negativo externo (água ultrapura estéril).

Após a análise das sequências, todas as amostras apresentaram as repetições pertencentes à cepa AmRio 1 (162, F, 17, F e F) (Tabela 4). Desta forma, não houve alteração nas sequências repetidas.

Tabela 4. Aminoácidos das sequências repetidas da MSP1a da cepa AmRio 1 de *Anaplasma marginale* e sua classificação segundo de la Fuente et al. (2007).

Aminoácidos da Sequência	Classificação (DE LA FUENTE et al., 2007)
ADSSSASGQQQESGVSSQSGQASTSSQLG	162
TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	F
TDSSSASGQQQESGVSSQSGQASTSSQLG	17
TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	F
TDSSSASGQQQESSVSSQSGQASTSSQLG	F

Em áreas endêmicas para a anaplasmosose as sequências repetidas podem apresentar alta variação, e pode ser encontrada mais de uma sequência repetida de MSP1a em alguns animais (DE LA FUENTE et al., 2001c; PALMER et al., 2001; SILVA et al., 2015a, 2015b). O número variável de sequências repetidas na proteína de MSP1a sugere que a duplicação destas sequências devido à recombinação homóloga pode ocorrer como “testes” para propiciar vantagens competitivas às diferentes cepas de *A. marginale* em uma determinada área geográfica (MUTSHEMBELE et al., 2014).

A alta diversidade de MSP1a vem sendo associada a diversos fatores, dentre eles está a elevada exposição à vetores, principalmente em áreas endêmicas (RUYBAL et al., 2009; SILVA et al., 2015a). Assim, acredita-se que alta diversidade genética em um determinado rebanho possa ser resultado de processos de transmissão distintos, como biológico, mecânico e via placenta (SILVA et al., 2015b). Logo, locais com população baixa de vetores teriam tendência à baixa diversidade genética da MSP1a de *A. marginale* (RUYBAL et al., 2009). Machado et al. (2015) observaram que no município de Mambaí, Goiás, os animais apresentavam apenas as cepas α - β^3 - Γ e E-F- ϕ^2 -F². Neste rebanho, era feito um controle sistemático de ectoparasitos e os achados de análise da diversidade de *mSP1a* resultaram em baixa heterogeneidade genética (MACHADO et al., 2015).

No mesmo estudo, no município de Lins, São Paulo, Machado et al. (2015) consideraram que a alta diversidade de *A. marginale* encontrada no rebanho, com 9 cepas identificadas (τ -10 -15, α - β^2 , α - β^3 -13, α - β^2 192, τ - β -100, α - β^2 - Γ , 193- β -100, 191-13- Γ e 191-13-18), era resultado de diferentes mecanismos de transmissão (mecânico e biológico). O presente estudo mostrou uma estabilidade das sequências repetidas durante infecção aguda e crônica no bezerro. Isto pode ter ocorrido devido à não exposição deste bezerro a vetores tanto biológicos quanto mecânicos, já que o animal permanecia em baía protegida. Outra hipótese aceita para aumento da diversidade genética da MSP1a, é o movimento de bovinos entre diferentes regiões, permitindo a introdução de novas cepas (DE LA FUENTE et al., 2007). O bezerro deste estudo após chegar na baía, não foi realocado em nenhum momento do estudo, bem como nenhum animal entrou em contato com o mesmo. Outro fator que é considerado, é que rebanhos infectados por longos períodos apresentam um aumento da diversidade genética de *A. marginale* (PALMER et al., 2001).

Palmer et al. (2001) observaram em rebanhos persistentemente infectados o surgimento de outras cepas de *A. marginale* através de deleções e substituições dos nucleotídeos em códons. Em um estudo de diversidade genética de *A. marginale* no Rio de Janeiro, Silva et al. (2015a) analisaram a relação entre a idade dos animais e variação dos aminoácidos das sequências repetidas presentes em MSP1a. Foi observado um aumento da diversidade genética de *A. marginale* em animais de 9 a 12 meses de idade com sequências possuindo 4 e 6 repetições. Isto sugere que a heterogeneidade genética tende a aumentar conforme o tempo de infecção aumenta. As variações foram vistas nas posições 1, 7, 8, 20 e 21, exibindo alta variabilidade, com cinco a seis diferentes aminoácidos presentes nestas posições (SILVA et al., 2015a). Assim, em infecções persistentes haveria maior diversidade genética de *A. marginale* (PALMER et al., 2001). Neste estudo, o período de observação do bovino foi de 3 meses. Este tempo pode ter sido insuficiente para a ocorrência de mutações no agente, já que este fenômeno é aleatório.

Acredita-se que diversidade genética de *A. marginale* pode ocorrer durante os ciclos sequenciais de replicação que caracterizam a infecção persistente (KIESSER et al., 1990) ou durante a replicação no intestino médio e glândulas salivares de carrapatos vetores (KOCAN et al., 1986, 1993). Desta forma, a replicação nos órgãos do carrapato pode ter associação com o aumento da heterogeneidade genética, pela possibilidade de mutação de *A. marginale* no hospedeiro invertebrado. Porém, não se conhece ainda o mecanismo que pode influenciar nesta alteração. Assim como o bezerro utilizado neste estudo, os carrapatos apresentaram apenas a cepa AmRio 1 presente tanto nas amostras de intestino quanto de glândula salivar e saliva. Como somente uma geração de carrapatos foi analisada, o curto tempo de avaliação destes também pode ter representado um empecilho para a observação da diversidade genética da MSP1a nos vetores.

A infecção ou não do carrapato por *A. marginale* parece estar relacionada ao intestino médio (RIBEIRO; LIMA, 1996) do carrapato, mais especificamente, à barreira de infecção do intestino (FUTSE et al., 2003). Após a infecção por *A. marginale* e invasão mediada por um receptor, o intestino médio (DAVEY, R.B; GEORGE, 2002) é o primeiro determinante da competência do vetor (FUTSE et al., 2003). A capacidade de *R. (B.) microplus* se infectar por cepas de regiões temperadas foi expressivamente reduzida durante a alimentação em bovinos persistentemente infectados. Para estas cepas, *R. (B.) microplus* teria menor competência vetorial (FUTSE et al., 2003). Isto pode estar relacionado à estrutura da MSP1a, já que sua primeira e última repetições são relacionadas a interação entre carrapato e parasita e conferem especificidade ao vetor e co-evolução do agente com o vetor (DE LA FUENTE et al., 2001c).

A positividade dos intestinos, glândulas salivares e saliva analisada, indica que a cepa AmRio 1 é transmitida por carrapatos *R. (B.) microplus*. Estas amostras, assim como as de sangue, apresentaram alta positividade para *A. marginale*, uma vez que os produtos de PCR se apresentavam tão intensos no gel que foram necessárias diluições das amostras de DNA para gerar um produto capaz de fornecer sequências que pudessem ser analisadas. Os carrapatos provavelmente estavam fixados no bezerro somente durante a infecção persistente de *A. marginale*, já que a infestação foi realizada um dia antes do pico de parasitemia. Mesmo assim, os carrapatos apresentaram alta positividade, provavelmente por consequência da alta replicação do patógeno nos órgãos do carrapato *R. (B.) microplus*. Ao mesmo tempo, o patógeno foi detectado em saliva de carrapatos, e mesmo após a adição de aproximadamente 150 microlitros de PBS Tween para atingir 200 microlitros de volume final nas amostras para a extração, foi observada a positividade para o agente, mostrando a alta concentração de *A. marginale* eliminado na saliva pelo vetor durante a alimentação, sugerindo a transmissão da cepa AmRio 1 por carrapatos da espécie *R. (B.) microplus*.

5 CONCLUSÕES

A cepa AmRio 1 de *A. marginale* se mostrou patogênica, provocando alterações clínicas severas no bezerro. Além de ser infectante ao carrapato *R. (B.) microplus*, o qual foi capaz de eliminar *A. marginale* através da saliva, indicando uma possível capacidade vetorial de *R. (Boophilus) microplus* na transmissão da cepa AmRio 1. No período de estudo de 3 meses a cepa AmRio 1 de *A. marginale* não apresentou alteração em suas sequências repetidas tanto em carrapatos quanto no bezerro, durante o período do estudo. Desta forma, estudos com um período mais longo de observação da infecção por *A. marginale* e com múltiplas infestações durante este período são necessários para estudar a diversidade genética de *msp1* α em condições experimentais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ANDRADE, G. M.; VIDOTTO, O.; VIDOTTO, M. C.; YOSHINARA, E.; KANO, F.S.; AMARAL, C.H.S. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos leiteiros e estudos sobre a dinâmica da infecção natural em bezerros holandeses no Sul do Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 22, n. 2, p. 155-159, 2001.

ANGELO, I.C. Avaliação dos perfis protéico e lipídico na resposta de *Rhipicephalus microplus* à infecção com fungos. 2011. 141F. Tese (Doutorado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R.; BASTOS, P. A. S.; MARQUES, A. P. C. Frequência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.50, n.3, p.243-246, 1998.

AUBRY P, GEALE DW. A review of bovine anaplasmosis. *Transboundary and emerging diseases*, v. 58, n. 1, p. 1–30, 2011.

BAÊTA, B.A.; RIBEIRO, C.C.D.U.; TEIXEIRA, R.C.; CABEZAS-CRUZ, A.; PASSOS, L.M.F.; ZWEYGARTH, E.; FONSECA, A.H. 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.

BARBET, A. F.; PALMER, G. H.; MYLER, P. J.; MCGUIRE, T. C. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infection and Immunity*, v. 55, n. 10, p. 2428–2435, 1987.

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

BARBET, A. F.; BLENTLINGER, R.; JOOYOUNG YI, LUNDGREN, A.M.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K.M. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 10, p. 102–107, 1999.

BARBET, A. F.; LUNDGREN, A.; JOOYOUNG YI, RURANGIRWA, F. R. ; PALMER, G. H. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* by expression of MSP2 mosaics. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 11, p. 6133–6138, 2000.

BARBET, A. F.; JOOYOUNG YI, LUNDGREN, A.; MCEWEN, B. R.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K.M. Antigenic variation of *Anaplasma marginale*: Major surface protein 2 diversity during cyclic transmission between ticks and cattle. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 5, p. 3057–3066, 2001.

BARROS, S.L; MADRUGA, C.R; ARAÚJO, F.R; MENK, C.F; ALMEIDA, M.A.O; MELO, E.P.S; KESSLER, R.H. Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 6, p. 513-517, 2005.

BOWIE, J. V.; DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K.M.; BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F. Conservation of major surface protein 1 genes of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. *Gene*, v. 282, n. 5, p. 95–102, 2002.

BRAYTON, K. A.; KNOWLES, D. P.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Efficient use of a small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 7, p. 4130–4135, 2001.

BRAYTON, K. A.; PALMER, G. H.; LUNDGREN, A.; JOOYOUNG YI; BARBET, A. F. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* msp2 occurs by combinatorial gene conversion. *Molecular Microbiology*, v. 43, n. 5, p. 1151–1159, 2002.

BRAYTON, K.A.; KAPPMAYER, L.S.; HERNDON, D.R.; DARK, M.J.; TIBBALS, D.L.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; KNOWLES, D.P., JR. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.102, n.1, p.844–849, 2005.

BRITO L.G.; OLIVEIRA M.C.S.; ROCHA R.B.; SILVA NETTO F.G.; MARIM A.D.; SOUZA G.C.R. & MOURA M.M.F. *Anaplasma marginale* infection in cattle from southwestern Amazônia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 30, n. 3, p. 249-254, 2010.

BROWN, W. C.; PALMER, G. H.; LEWIN, H. A.; MCGUIRE, T. C. CD4(+) T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 11, p. 6853–6862, 2001.

BROWN, W. C., BRAYTON, K. A., STYER, C. M. & PALMER, G. H. The hypervariable region of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 (MSP2) contains multiple immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes that elicit variant-specific proliferative and IFN- γ responses in MSP2 vaccinates. *The Journal of Immunology*. v. 170, n. 7, p. 3790–3798, 2003.

CABEZAS-CRUZ, A.; PASSOS, L.M.F.; LIS, K.; KENNEIL, R.; VALDÉS, J.J.; FERROLHO, J.; TONK, M.; POHL, A.E.; GRUBHOFFER, L.; ZWEYGARTH, E.; SHKAP, V.; RIBEIRO, M.F.B.; ESTRADA, PEÑA, A.; KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J. Functional and Immunological Relevance of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 1a Sequence and Structural Analysis. *Plos One*, v.8, n.6, p.1-13, 2013.

DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E. Efficacy of macrocyclic lactone endec-tocides against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infested cattle using different pour-on application treatment regimes. *Journal Medical Entomology*, v. 39, n.5, p.763–769, 2002.

DE LA FUENTE, J.; HIDALGO, Y.; OCHAGAVIA, M.E.; MUZIO, V.; RODRÍGUEZ, M.P. Analysis of enterovirus sequences recovered from the cerebrospinal fluid of patients with epidemic neuropathy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.93, n.2, p.153–161, 1999.

DE LA FUENTE, JOSE; GARCIA-GARCIA, JOSE C; BLOUIN, EDMOUR F; MCEWEN, BRIAN R; CLAWSON, DOLLIE; KOCAN, KATHERINE M. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. *International Journal for Parasitology*. v. 31, n. 14, p. 1705-1714, 2001a.

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

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

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

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

DE LA FUENTE J1, GARCIA-GARCIA JC, BLOUIN EF, KOCAN KM. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. *International Journal for Parasitology*. v. 31, n. 2, p. 145-153, 2001f.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; GARCIA-GARCIA, J. C.; RODRÍGUEZ, S. D.; GARCÍA, M. A.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; PASSOS, L.M.; BLOUIN, E. F. & KOCAN, K.M. Phylogeography of New World isolates of

Anaplasma marginale (Rickettsiaceae: Ehrlichieae) based on major surface protein sequences. *Veterinary Microbiology*, v. 88, n. 3, p. 275–285, 2002.

DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K.M. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Veterinary Microbiology*, v. 91, n. 2-3, p. 265–283, 2003a.

DE LA FUENTE, J.; GOLSTEYN THOMAS, E. J.; VAN DEN BUSSCHE, R. A.; HAMILTON, R. G.; TANAKA, E. E.; DRUHAN, S. E. & KOCAN, K.M. Characterization of *Anaplasma marginale* isolated from North American bison. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 8, p. 5001–5005, 2003b.

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

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

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

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

DIKMANS, G. The transmission of anaplasmosis. *American Journal of Veterinary Research*, v.11, n. 1, p.5–16, 1950.

DOUGLAS, J. W.; WARDROP, K. J. Schalm's Veterinary hematology. 6ed. Wiley Blackwell, 2010. 1232p.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in families Rickettsiaceae and Anasplamataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “EGH agent” as subjective

synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v.51, n.6, p.2145- 2165, 2001.

ERIKS, I.S.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C; ALLRED, D.R.; BARBET, A.F. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* in carrier cattle using a nucleic acid probe. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 27, n. 2, p. 279-284, 1989.

ESTRADA-PENÑA, A.; NARANJO, V.; ACEVEDO, WHITEHOUSE, K.; MANGOLD, A.J.; KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J. Phylogeographic analysis reveals association of tick, borne pathogen, *Anaplasma marginale*, MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. *BMC Biology*, v.7, n.57, p.1-13, 2009.

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

FRANCO, P.F. Caracterização da ação da saliva do carrapato *Amblyomma cajennense* (Acari; Ixodidae) sobre a via clássica do sistema complemento. 2015. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FRENCH, D.M.; MCELWAIN, T.F.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 3, p. 1200–1207, 1998.

FRENCH, D.M.; BROWN, W.C.; PALMER, G.H. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 11, p. 5834–5840, 1999.

FOIL, L.D. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitology Today* v. 5, n. 3, p. 88–96, 1989.

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

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

GE, N. L.; KOCAN, K.M.; BLOUIN, E. F. & MURPHY, G. L. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales : Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari : Ixodidae) infected as adults by using non-radioactive in situ hybridization and microscopy. *Journal of Medical Entomology*, v. 33, n. 6, p. 911–920, 1996.

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

GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*, v.57, n.1, p.109-119, 1995.

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

KOCAN, K.M. Development of *Anaplasma marginale* in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. In J.R. Sauer and J.A. Hair (ed.), Morphology, physiology and behavioral ecology of ticks. Horwood, Chichester, United Kingdom, p. 472-505, 1986.

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

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

KOCAN, K.M.; GOFF, W.L.; STILLER, D.; EDWARDS, W.; EWING, S.A.; CLAYPOOL, P.L.; MCGUIRE, T.C.; HAIR, J.A.; BARRON, S.J. Development of *Anaplasma marginale* in salivary glands of male *Dermacentor andersoni*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 54, n. 1, p. 107-112, 1993.

KOCAN, K.M.; BLOUIN, E. F.; BARBET, A. F. Anaplasmosis control: past, present and future. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 916, p. 501–509, 2000.

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

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

KOCAN, M.K.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E.F.; COETZEE, J.F.; EWING, S.A. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, v. 167, n. 2-4, p. 95-107, 2010.

LEW, A.E.; BOCK, R.E.; MINCHIN, C.M.; MASAKA, S. A msp1a polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Veterinary Microbiology*, v.86, n.4, p.325–335, 2002.

MACHADO, R.Z.; SILVA, J.B.; ANDRÉ, M.R.; GONÇALVES, L.R.; MATOS, C.A.; OBREGÓN, D. Outbreak of anaplasmosis associated with the presence of different *Anaplasma marginale* strains in dairy cattle in the states of São Paulo and Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 24, n. 4, p. 438-446, 2015.

MAHONEY, D. F.; ROSS, D. R. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Australian Veterinary Journal*, v. 48, n. 1, p. 292-298, 1972.

MARANA, E.R.M.; DIAS, J.A.; FREIRE, R.L.; VICENTINI, J.C.; VIDOTTO, M.C.; VIDOTTO, O. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos da região Centro-Sul do estado do Paraná, Brasil, por um teste imunoenzimático competitivo utilizando proteína recombinante MSP5-PR1. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 1, p. 20-26, 2009.

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

MEEUS, P. F.; BARBET, A. F. Ingenious gene generation. *Trends in Microbiology* 9, 353–355, 2001.

MEEUS, P. F. M., K. A. BRAYTON, G. H. PALMER, AND A. F. BARBET. Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogs of *Anaplasma marginale*. *Molecular Microbiology* v. 47, n. 3, p. 633-643, 2003.

MUNDERLOH, U.G.; BLOUIN, E.F.; KOCAN, K.M.; GE, N.L.; EDWARDS, W.L.; KURTTI, T.J. Establishment of the tick (Acari:Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales:Anaplasmataceae) in tick cell culture. *Journal of Medical Entomology*, v. 33, n. 4, p. 656-664, 1996.

MUTSHEMBELE, A.M.; CABEZAS, CRUZ, A.; MTSHALI, M.S.; THEKISOE, O.M.M.; GALINDO, R.C.; DE LA FUENTE, J. Epidemiology and evolution of the genetic variability of *Anaplasma marginale* in South Africa. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v.5, n.6, p.624-631, 2014.

NDUNG'U, L. W., C. AGUIRRE, F. R. RURANGIRWA, T. F. MCELWAIN, D. P. KNOWLES, AND G. H. PALMER. Detection of *Anaplasma ovis* infection in goats by major surface protein 5 competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n.3, p. 675–679, 1995.

OBERLE, S.M.; PALMER, G. H.; BARBET, A. F. & MCGUIRE, T. C. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. *Infection and Immunity*, v. 56, n. 6, p. 1567–1573, 1988.

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

- PALMER, G. H.; WAGHELA, S. D.; BARBET, A. F.; DAVIS, W. C.; MCGUIRE, T. C. Characterization of a neutralization sensitive epitope on the AM 105 surface protein of *Anaplasma marginale*. *Journal of Parasitology*. v. 17, n. 7, p. 1279–1285, 1987.
- PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F. R.; MCELWAIN, T. F. Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 2, p. 631–635, 2001.
- POHL, A.E.; CABEZAS-CRUZ, A.; RIBEIRO, M.F.B.; SILVEIRA, J.A.G.; SILAGHI, C.; PFISTER, K.; PASSOS, L.M.F. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais. Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v.22, n.1 p.129-135, 2013.
- POTGIETER, F.T. Epizootiology and control of anaplasmosis in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*. v. 504, n. 4, p. 367–372, 1979.
- POTGIETER, F.T.; VANRENSBURG, L. The persistence of colostral *Anaplasma marginale* antibodies and incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, v.54, n.4, p.557-560, 1987.
- RECK, J.; BERGER, M. O.; TERRA, R. M. S.; MARKS, F. S.; da SILVA VAZ JÚNIOR, I.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Research in Veterinary Science*, v. 86, n. 1, p. 56-62, 2009.
- RIBEIRO, M.F.B.; REIS, R. Natural exposure of calves to *Anaplasma marginale* in edemic areas of Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.33, n.1, p.63-66, 1981.
- RIBEIRO, M. F. B; LIMA, J. D. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v.61, n. 1-2, p. 31–39, 1996.
- RICHEY, E.J.; Bovine anaplasmosis. In: Howard, R.J. (Ed.), *Current Veterinary Therapy Food Animal Practice*. The W.B. Saunders Co., pp. 767–772, 1981.
- RISTIC, M. Anaplasmosis. *Advanced Veterinary and Animal Research*. v. 6, n. 1, p. 111-192, 1960.
- RISTIC, M. Bovine anaplasmosis. In: Kreier, J. *Parasitic Protozoa*. (Ed.), v.4. *Academic Press*, New York, p.235–249, 1977.
- RODRIGUEZ, S. D.; GARCIA ORTIZ, M. A.; HERNANDEZ SALGADO, G.; SANTOS CERDA, N. A.; ABOYTES TORRE, R.; CANTO ALARCON, G. J. *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration against a homologous challenge. *Comparative Immunology Microbiology of Infectious Diseases*, v. 23, n. 4, p. 239–252, 2000.

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

SCOLES, G.A.; UETI, M.W.; PALMER, G.H. Variation among geographically separated populations of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) in midgut susceptibility to *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). *Journal of Medical Entomology*, v.42, n.2, p.153-162, 2005.

SILVESTRE, B.T.; SILVEIRA, J.A.; MENESES, R.M.; FACURY-FILHO, E.J.; CARVALHO, A.U.; RIBEIRO, M.F. Identification of a vertically transmitted strain from *Anaplasma marginale* (UFMG3): Molecular and phylogenetic characterization, and evaluation of virulence. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. v. 7, n. 1, p. 84-84, 2016.

SINGH, H., HAQUE, J.M., SINGH, N.K., RATH, S.S. Molecular detection of *Anaplasma marginale* infection in carrier cattle. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v. 3, n. 1, p. 55–58, 2012.

SILVA, J.B.; CORDEIRO, M.D.; CASTRO, G.N.S.; SANTOS, P.N.; FONSECA, A.H.; REIS, A.B.; SILVA, N.S.; BARBOSA, J.D. Ocorrência sorológica de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em bovinos e bubalinos no estado do Pará, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 35, n. 5, p. 2495-2500, 2014a.

SILVA, J.B.; CASTRO, G.N.S.; FONSECA, A.H. Longitudinal study of risk factors for anaplasmosis and transplacental transmission in herd cattle. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 35, n. 4, p. 2491-2500, 2014b.

SILVA, J.B.; GONÇALVES, L.R.; VARANI, ADE M.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* studied longitudinally under natural transmission conditions in Rio de Janeiro, Brazil. *Tick and Tick Borne Diseases*. v. 6, n. 4, p. 499-507, 2015a.

SILVA, J.B.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 7, n. 1, p. 20-25, 2015b.

SOUZA J.C.P.; SOARES C.O.; MASSARD C.L.; SCOFIELD A.; FONSECA A.H. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 20, n. 3, p. 97-101, 2000.

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

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

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

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

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

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

WICKWIRE, K. B.; KOCAN, K.M.; BARRON, S. J.; EWING, S. A.; SMITH, R. D.; HAIR, J. A. Infectivity of three *Anaplasma marginale* isolates for *Dermacentor andersoni*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 48, n. 1, p. 96–99, 1987.

ZAUGG, J.L; KUTTLER, K.L. Bovine anaplasmosis: in utero transmission and the immunologic significance of ingested colostral antibodies. *American Journal of Veterinary Research*, v.45, n.3, p.440-443, 1984.