

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Detecção e diferenciação de *Anaplasma marginale* e *Anaplasma centrale* por reação em cadeia de polimerase (PCR)

Ana Carolina Perpétua Joazeiro

PORTO ALEGRE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Detecção e diferenciação de *Anaplasma marginale* e *Anaplasma centrale* por reação em cadeia de polimerase (PCR)

Autor: Ana Carolina Perpétua Joazeiro

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior

Co-orientadora: Dra. Adriana Seixas

PORTO ALEGRE

2012

Ana Carolina Perpétua Joazeiro

Deteccção e diferenciação de *Anaplasma marginale* e *Anaplasma centrale* por reação em cadeia de polimerase (PCR)

Aprovada em:

APROVADO POR:

Prof. Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Cláudio W. Canal
Membro da Comissão

Prof. Dr. João Ricardo de Souza Martins
Membro da Comissão

Prof^ª.Dr^ª. Nara Amélia da Rosa Farias
Membro da Comissão

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal, do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul-UFRGS. Com o apoio financeiro da FAPERGS, CNPq e INCT-Entomologia Molecular.

Dedico este trabalho aos meus pais Célia e Hudson, meus eternos portos seguro.

Dedico-o também ao amor da minha vida, meu namorado Danilo, meu companheiro de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força, proteção e sabedoria para que eu pudesse realizar este trabalho.

Aos meus pais Célia e Hudson por mesmo longe, estarem sempre me incentivado a estudar. Sem vocês eu não estaria aqui superando meus desafios.

Ao meu namorado Danilo, por todas as ajudas noturnas e incentivos. Por estar sempre me ouvindo e acalmando minhas angústias, principalmente pela paciência, amor e dedicação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior pelas oportunidades, aprendizagens e ensinamentos.

À minha co-orientadora Adriana Seixas pela amizade, auxílio e sugestões.

À professora Aoi Masuda pelos ensinamentos.

Às minhas amigas e amigos Aline Domingues Schuler, Paula Cristiane Pohl, Daiane Patrícia Oldiges, Lucas Tirloni, Abid Ali, Melina Garcia Guizzo, Mariana Loner Coutinho, Tadeu Silva Dourado, Fernanda Rodrigues, Viviane Ferreira, Anelise dos Santos Klein, Karine Zimmer e Lucas deDavid pela amizade, carinho e incentivo.

Ao Dr. José Reck Junior pela ajuda e amostras fornecidas, muito obrigada!

Ao Dr. João Ricardo Martins pelas amostras fornecidas, muito obrigada!

Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

À Faculdade de Veterinária e ao Centro de Biotecnologia.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

E obrigado também a todos que me apoiaram indiretamente neste trabalho.

RESUMO

O patógeno intracelular *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) é endêmico em muitas regiões tropicais e subtropicais do mundo. A infecção do bovino com *A. marginale* causa anaplasmosse bovina, devido à replicação do microrganismo nos eritrócitos do hospedeiro, sendo responsável por consideráveis perdas econômicas à criação de gado. A transmissão de *A. marginale* para bovinos ocorre biologicamente por carrapatos ou mecanicamente por insetos hematófagos e instrumentos contaminados com sangue infectado. Uma cepa de *A. centrale*, naturalmente atenuada tem sido usada extensivamente para controle da anaplasmosse bovina em diversas regiões do mundo. A vacina de *A. centrale* é produzida em bovinos esplenectomizados oriundos de áreas livres de carrapato, todavia uma contaminação acidental por *A. marginale* é um risco durante o processo de produção. Por este motivo, a produção da vacina deve ser avaliada, para garantir uma amostra de *A. centrale* livre de contaminação. Durante a fase aguda da doença, o diagnóstico é realizado pela observação de *A. marginale* por esfregaço sanguíneo, porém durante a fase crônica, este método não tem a sensibilidade necessária para detectar animais que portam níveis baixos de parasitemia. Sendo, o método de detecção molecular o mais indicado para detectar tanto anaplasmosse aguda quanto crônica e diferenciar entre *A. marginale* e *A. centrale*. Deste modo, no presente trabalho um ensaio de PCR foi padronizado para detectar e diferenciar *A. marginale* de *A. centrale* em amostras de sangue bovino. Foram utilizados *primers* para o gene *msp4* de *Anaplasma* sp. para a amplificação do material obtido a partir de uma extração de DNA de sangue congelado de bovinos experimentalmente infectados com *A. centrale* e *A. marginale*. A PCR se mostrou específica, sem amplificar o DNA de outros hemoparasitas. O teste se mostrou sensível para detectar a quantidade 0,25 pg para o DNA de *A. centrale* e 0,125 pg para detectar o DNA de *A. marginale*, mostrando-se útil para detectar animais à campo persistentemente infectados com *A. marginale* e vacinados com *A. centrale*, os quais foram indetectáveis pela microscopia óptica. Em resumo, a PCR é um teste mais sensível e específico que a microscopia óptica para detectar e diferenciar as espécies de *A. centrale* e *A. marginale*, mostrando-se útil para auxiliar no controle de qualidade durante a produção da vacina.

Palavras - chaves: *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, diagnóstico, controle, proteção.

ABSTRACT

The intracellular pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae), is endemic in many tropical and subtropical regions of the world. Infection of cattle with *A. marginale* causes bovine anaplasmosis, due to replication of the microorganism inside the erythrocytes being responsible for considerable economic losses to livestock. The transmission of *A. marginale* to cattle occurs biologically by ticks or mechanically by blood sucking insects and instruments contaminated with infected blood. A strain of *A. centrale*, naturally attenuated, has been used extensively to control bovine anaplasmosis in various regions of the world. The vaccine with *A. centrale* is produced in splenectomized cattle from tick-free areas, however accidental contamination by *A. marginale* represents a risk during the production process. Therefore, production of the vaccine should be evaluated to ensure a sample of *A. centrale* free of contamination. During the acute phase of the disease, diagnosis is made by observing *A. marginale* by blood smear, but during the chronic phase, this method is not as sensitivity as required to detect animals that carry low levels of parasitemia. Being, the molecular detection method more appropriate for detecting both acute and chronic anaplasmosis and differentiate between *A. centrale* and *A. marginale*. Thus, in this study a PCR assay was standardized to detect and differentiate *A. centrale* and *A. marginale* in samples of bovine blood. Primers for *msp4* gene of *Anaplasma* sp. were used for amplification of material obtained from a DNA extraction of frozen blood from bovines experimentally infected with *A. centrale* and *A. marginale*. The PCR showed to be specific, do not amplifying the DNA of other hemoparasites. The test was sensitive to detect the amount of 0.25 pg of DNA from *A. centrale* and 0.125 pg of DNA from *A. marginale*, proving to be useful for detecting field animals persistently infected with *A. marginale* and vaccinated with *A. centrale*, which were undetectable by optical microscopy. Briefly, PCR is a more sensitive and specific test than the optical microscopy analysis to detect and differentiate the species *A. centrale* and *A. marginale* showing to be useful to assist the quality control during the vaccine production.

Key-words: *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, diagnosis, control, protection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo de vida da <i>Anaplasma marginale</i> em bovinos e carrapatos.....	24
Figura 2. <i>A. marginale</i> em eritrócitos circulantes.....	28
Figura 3. <i>A. centrale</i> em eritrócitos circulantes	28
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente à PCR de padronização da temperatura de anelamento dos <i>primers</i> para o gene <i>msp4</i> de <i>A. centrale</i>	50
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente à PCR de padronização da temperatura de anelamento dos <i>primers</i> para o gene <i>msp4</i> de <i>A. marginale</i>	50
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente à PCR de padronização da concentração do cloreto de magnésio para as amostras de DNAg de <i>A. centrale</i> , com seu respectivo <i>primer</i> para o gene <i>msp4</i>	51
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente à PCR de padronização da concentração do cloreto de magnésio para as amostras de DNAg de <i>A. marginale</i> , com o par de <i>primer</i> para seu respectivo gene <i>msp4</i>	52
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente à PCR de padronização da concentração de <i>primers</i> para as amostras de DNAg de <i>A. centrale</i> e <i>A. marginale</i> , com os respectivos <i>primers</i> para o gene <i>msp4</i>	53
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente ao teste de sensibilidade da PCR padronizada com os <i>primers</i> para o gene <i>msp4</i> de <i>A. centrale</i>	55
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente ao teste de sensibilidade da PCR padronizada com os <i>primers</i> para o gene <i>msp4</i> de <i>A. marginale</i>	55
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente à análise da especificidade dos <i>primers</i> para o gene <i>msp4</i> de <i>A. centrale</i> e para o gene <i>msp4</i> de <i>A. marginale</i> da PCR padronizada.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Projeto dos <i>primers</i> para detecção dos genes <i>msp1α</i> , <i>msp3</i> e <i>msp4</i>	46
Tabela 2. Comparação dos resultados de microscopia e PCR.....	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Epidemiologia	15
1.2 Transmissão	17
1.3 Vetores, reservatórios e portadores	19
1.4 Taxonomia, morfologia e desenvolvimento.....	21
1.5 Patologia e sinais clínicos	25
1.6 Diagnósticos	27
1.6.1 Diagnósticos diretos	28
1.6.2 Diagnósticos indiretos	29
1.7 Imunidade contra <i>A. marginale</i>	30
1.8 Proteínas de superfície principal de <i>A. marginale</i>	32
1.9 Outras proteínas de membrana	36
1.10 Imunização	37
1.11 Vacina viva de <i>A. centrale</i>	39
1.12 Controle de qualidade da vacina de <i>A. centrale</i>	42
1.13 Quimioterapia	43
2.OBJETIVOS.....	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Obtenção do material biológico	44
3.2 Extração do DNAg	45
3.3 Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase.....	45
3.3.1 Temperatura de anelamento dos <i>primers</i>	47
3.3.2 Concentração de cloreto de magnésio (MgCl ₂)	47
3.3.3 Quantidade dos <i>primers</i>	47
3.3.4 Quantidade de DNA molde de <i>Anaplasma</i> sp.....	48
3.3.5 Estimativa do limite de detecção da PCR	48
3.3.6 Especificidade analítica dos <i>primers</i>	48
3.4 Sequenciamento do amplicon	48
3.5 Comparação entre PCR e microscopia	49
4. RESULTADOS	49
4.1 Temperatura de anelamento dos <i>primers</i>	49
4.2 Concentração de cloreto de magnésio (MgCl ₂)	51
4.3 Quantidade de <i>primers</i>	52
4.4 Quantidade de DNA molde de <i>Anaplasma</i> sp.	53
4.5 Reação da PCR convencional padronizada	53
4.6 Estimativa do limite de detecção da PCR	54
4.7 Especificidade dos <i>primers</i>	56
4.8 Sequenciamento dos amplicons	57
4.9 Comparação entre PCR e microscopia	57
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO	62
7. PERSPECTIVAS	62
8. REFERENCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

A anaplasmoze bovina é uma doença não contagiosa decorrente de uma infecção por *Anaplasma marginale* transmitida principalmente por carrapatos (AUBRY and GEALE, 2011) e constitui um dos principais fatores limitantes para o melhoramento da produtividade bovina em áreas tropicais e subtropicais do mundo. A distribuição de *A. marginale* ocorre entre as coordenadas 40° N e 32° S, incluindo Américas, Europa, Ásia, África e Oceania (KOCAN et al., 2003). Nas regiões onde a multiplicação do vetor ocorre o ano todo, assim como em muitos países da América Latina, os bovinos tornam-se infectados naturalmente logo no primeiro ano de vida (KOCAN et al., 2003; VIDOTTO e MARANA, 2001), estabelecendo-se um equilíbrio natural devido à uma parasitemia moderada desde o nascimento (ERIKS et al., 1989). Em regiões de instabilidade enzoótica, isto é, em regiões onde infestações de carrapatos não são constantes, os bovinos por ficarem longos períodos sem contato com o parasita, têm seus níveis de anticorpos diminuídos, da mesma forma que animais de áreas livres e surtos de anaplasmoze podem ocorrer pela introdução desses bovinos em áreas com presença do parasita. Em áreas denominadas livres, nas quais a sobrevivência, multiplicação e atividade do artrópode vetor, os carrapatos, não são efetivas devido às condições climáticas (ESTRADA-PENA et al., 2012), a doença pode vir a ocorrer no caso de entrada acidental de carrapatos em períodos favoráveis a sua sobrevivência, assim como por outros vetores mecânicos.

O percentual de animais doentes e a taxa de mortalidade dependem de algumas condições epidemiológicas, tais como: número de vetores no ambiente, estado nutricional e doenças concomitantes (KIESER et al., 1990). As perdas devido à anaplasmoze são de grande importância comercial e variam entre raça, sexo, idade e parâmetros fisiológicos, de forma que os prejuízos causados à produtividade bovina são devidos desde a presença do carrapato até a transmissão do agente. O carrapato por si só gera queda na produção de carne, leite e na qualidade do couro. Além do que, os problemas causados pelo uso de acaricidas como método de controle deste vetor, podem

às vezes ser mais importantes que aqueles prejuízos causados pelo próprio agente (JONSSON et al., 2001). Estima-se que as perdas geradas pela anaplasmosose podem alcançar até 300 milhões de dólares por ano nos Estados Unidos, e aproximadamente 800 milhões de dólares na América Latina (KOCAN et al., 2003). No entanto, para o Brasil que possui o segundo maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com mais de 200 milhões de cabeças de gado distribuídas em todo o território nacional e o qual lidera o ranking de maior exportador de carne bovina do mundo (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2012), ainda não foram calculados tais prejuízos (SOUZA et al., 2001). As perdas geradas pela anaplasmosose são estimadas através da análise da perda de peso, redução da produção do leite, número de abortos, custos do tratamento e índices de morbidade e mortalidade dos bovinos (KOCAN et al., 2003).

Por meio de uma política de erradicação através de notificação obrigatória, a anaplasmosose foi erradicada no Canadá desde 1969 (HOWDEN et al., 2010). No Brasil, a anaplasmosose é endêmica em algumas regiões (MARANA et al., 2009; BARROS et al., 2005; SOUZA et al., 2001; GONÇALVES, 2000). Entre as áreas consideradas de estabilidade enzoótica para *A. marginale* estão as mesorregiões do Vale do Paraíba-RJ (SOUZA et al., 2001), do Norte Fluminense-RJ (SOUZA et al., 2000), do norte do Paraná (VIDOTTO et al., 1998) e os Estados de Rondônia, Acre (BRITO et al., 2006) e Bahia (BARROS et al., 2005). Já as áreas consideradas de instabilidade enzoótica incluem toda a região sudeste do Brasil (GONÇALVES, 2000), a região do nordeste do Estado do Pará (GUEDES, Jr. et al., 2008) e a região do centro-sul do Estado do Paraná (MARANA et al., 2009). No Rio Grande do Sul, o número de carrapatos é variável devido ao frio e ocorrência irregular de chuvas durante o ano. Condições climáticas amenas favorecem o desenvolvimento de pastagens, facilitando o encontro parasito-hospedeiro, acarretando níveis elevados de infestação. Segundo Farias (2001), os municípios de Santa Vitória do Palmar, parte dos municípios de Jaguarão e Arroio Grande são regiões livres de carrapatos e a maioria dos surtos é proveniente dos municípios de Pelotas, Capão do Leão e Rio Grande.

No entanto, a epidemiologia da anaplasmosose pode ser sensível às mudanças climáticas, devido ao aquecimento global. Estimativas de aumento na temperatura média entre 1 - 3,5°C pode ser impactante na biologia e no habitat natural dos

carrapatos, gerando o aparecimento de carrapatos em regiões não habitáveis anteriormente, além de tudo sobre a ocorrência de transmissão e surtos da doença (GITHEKO et al., 2000).

1.2 Transmissão

Os métodos de transmissão de *Anaplasma* sp. incluem as formas biológica, mecânica e iatrogênica. A forma biológica ocorre através de artrópodes hematófagos, nos quais os carrapatos são os principais vetores. Durante os três estádios de vida parasitária, o carrapato pode infectar-se e transmitir *A. marginale* para o bovino. Pode ocorrer de estágio para estágio, quando o carrapato se infecta em um estágio e transmite para o estágio seguinte (transestadial ou interestadial), em carrapatos de um único hospedeiro, monoxenos, como o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (AGUIRRE et al., 1994) e em carrapatos de múltiplos hospedeiros como o *Dermacentor variabilis* (KOCAN et al., 1980) ou ainda dentro do mesmo estágio (intraestadial) de larvas, ninfas ou adultos. Acredita-se que a transmissão intraestadial por carrapatos machos, destacando as espécies *R. microplus* na América do Sul, *Dermacentor andersoni* e *Dermacentor variabilis* nos Estados Unidos, é um importante mecanismo de transmissão biológica. Assim como os próprios bovinos, os carrapatos machos tornam-se persistentemente infectados, devido à infecção generalizada e persistente nas células intestinais e glândula salivar. A replicação bacteriana dentro das células do epitélio intestinal e das células dos ácinos da glândula salivar do carrapato permite que este vetor seja capaz de adquirir o microrganismo de bovinos persistentemente infectados e transmiti-lo para novos bovinos susceptíveis (SCOLES et al., 2008), ainda que o *R. microplus*, apesar de realizar duas ecdises num único hospedeiro, pode mudar de hospedeiro num segundo instar e transmitir a infecção para múltiplos bovinos susceptíveis (PALMER et al., 2001; KOCAN, 1992; KOCAN et al., 1992b).

A transmissão mecânica geralmente ocorre por insetos hematófagos tais como as moscas dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*) e os tabanídeos (*Tabanus* sp.), popularmente conhecidos como mutucas (KESSLER, 2001). Os tabanídeos, apesar de apresentarem um grande aparato bucal, uma alimentação frequente e ininterrupta, são

menos eficientes que os carrapatos na transmissão de *A. marginale* (SCOLES et al., 2008), pois os carrapatos se tornam infectados mesmo depois de um pequeno período de alimentação em bovinos com infecção aguda ou crônica (ERIKS et al., 1993). Em certas áreas dos Estados Unidos, América Central, América do Sul e África existem isolados geográficos de *A. marginale* não infectivos em carrapatos, os quais parecem ter sua transmissão realizada mecanicamente por espécies de moscas como *Tabanus* sp. e *Stomoxys* sp. (DE LA FUENTE et al., 2001b; WICKWIRE et al., 1987). No Brasil, a disseminação da anaplasmose por dípteros hematófagos ocorre com maior intensidade em épocas quentes e úmidas, quando a população desses vetores é maior (KESSLER, 2001). A transmissão da *Anaplasma* sp. deve ocorrer dentro de poucos minutos já que o microrganismo não sobrevive mais que cinco minutos fora do animal (HAWKINS et al., 1982). Dessa forma a transmissão por insetos hematófagos é efetiva se os bovinos estiverem próximos e a picada for imediata entre um bovino infectado e um bovino saudável (susceptível) (WHITTIER et al., 2009). Quando ocorre a utilização da mesma agulha para todos os animais, através de seringas automáticas ou quando não se observa os cuidados necessários de lavagem e esterilização dos instrumentos de cirurgia, entre um animal e outro caracteriza-se a transmissão iatrogênica (KOCAN et al., 2005). A transmissão transovariana, embora já tenha sido demonstrada em *D. andersoni* (HOWELL, STILES and MOE, 1941), ainda é bastante controversa, pois não foi claramente demonstrado ocorrer em outras espécies de carrapatos infectados com *A. marginale* (KOCAN et al., 2004).

É sugerido que *A. marginale* tenha co-evoluído com o *R. microplus*, devido ao fato de sua subespécie, *Anaplasma centrale* (THEILER, 1911), ser transmitida apenas pelo carrapato *Rhipicephalus simus* encontrado na África (POTGIETER, 1979; POTGIETER and VAN, 1987). Estudos demonstraram que diferentes isolados de *A. marginale* são infectantes para os bovinos, mas não para carrapatos, como os isolados Flórida, Illinois e Califórnia de *A. marginale*, devido às propriedades de adesão dos isolados (KOCAN et al., 2003; DE LA FUENTE et al., 2002; DE LA FUENTE et al., 2001b). É suposto que as repetições em tandem da região N-terminal da principal proteína de superfície 1 alfa (MSP1a), a qual tem como função biológica a adesão em células de carrapatos e de bovinos, seja um pré-requisito essencial e suficiente para mediar a infecção das células do carrapato e hospedeiro mamífero (DE LA FUENTE et

al., 2001b). Comparações genômicas revelaram polimorfismos entre as cepas de *A. marginale* (DARK et al., 2006). Todas, incluindo as cepas não transmitidas por carrapato, codificaram as repetições na porção N-terminal da MSP1a, exceto *A. centrale*, a qual pode ser representada como um grupo externo às cepas de *A. marginale*, pois utiliza um mecanismo alternativo para invadir o epitélio intestinal que não a MSP1a. Dessa forma é sugerido que a transmissão de *A. centrale* não está restrita apenas à capacidade de adesão, invasão e replicação dentro das células do epitélio intestinal e glândula salivar, de modo que estas bactérias foram bem sucedidas em *D. andersoni*, porém sem efetiva transmissão para bovinos susceptíveis (UETI et al., 2007). A possível explicação para a cepa *A. centrale* não ser transmitida por *D. andersoni* pode incluir desde a replicação dentro de um tipo acinar errado, ausência de uma sinalização vetor-patógeno eficiente para o desenvolvimento da infecção, ineficiente secreção na saliva ou a cepa não sobreviver no início da transmissão para o hospedeiro. Já a cepa Mississippi de *A. marginale*, a qual apresenta similar falha de transmissão como à cepa Flórida, a falha pode estar relacionada com a ineficiência de colonização do intestino médio do *D. andersoni*, pois embora tenha apresentado altos níveis de parasitemia em bovinos, todos os carrapatos *D. andersoni* alimentados com esta cepa apresentaram menores níveis de replicação no intestino médio total quando comparada à alimentação com a cepa Sta Maries. Contudo, é sugerido que existam fenótipos de transmissão conservados, positivos e negativos, entre as cepas de *A. marginale*, e diferenças entre as espécies de carrapatos, que determinam a ocorrência de uma eficiente interação em nível de adesão, sobrevivência e replicação (UETI et al., 2007). De forma que a eficiência da transmissão de *Anaplasma* sp. para bovinos susceptíveis engloba múltiplos fatores, os quais incluem desde nicho específico dentro do hospedeiro, rápido crescimento na dose infecciosa, manutenção de infectividade fora do hospedeiro à disponibilidade de novos hospedeiros (PALMER et al., 2009a).

1.3 Vetores, reservatórios e portadores

Os carrapatos *R. annulatus* no México e E.U.A. e o *R. microplus* no Brasil, são importantes vetores de *A. marginale* em bovinos, enquanto que algumas espécies de *Dermacentor* como *D. andersoni*, *D. variabilis* e *D. albipictus* são importantes vetores

nos Estados Unidos (KOCAN et al., 2009). Cerca de 20 espécies de carrapatos em todo o mundo são descritos como transmissores biológicos de *A. marginale* (KOCAN et al., 2004). Dentre as espécies do gênero *Rhipicephalus* transmissores estão: *Rhipicephalus annulatus*, *Rhipicephalus calcaratus*, *Rhipicephalus decoloratus*, *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus evertsi*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus bursa* e *Rhipicephalus simus* dentre as espécies do gênero *Dermacentor* estão: *Dermacentor albipictus*, *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor hunteri*, *Dermacentor occidentalis* e *Dermacentor variabilis*, e as espécies *Ixodes ricinus*, *Ixodes scapularis*, *Argas persicus*, *Ornithodoros lahorensis*, *Hyalomma excavatum* e *Hyalomma rufipes*. As espécies do gênero *Amblyomma* parecem não transmitir nenhum isolado de *A. marginale*, e algumas espécies do gênero *Dermacentor* não transmitem os isolados Flórida, Califórnia e Illinois de *A. marginale*. Em geral, os carrapatos vetores de *A. marginale* são *Rhipicephalus* spp. e *Dermacentor* spp. (GUGLIELMONE,1995; WICKWIRE et al., 1987).

O gênero *Anaplasma* inclui três patógenos de ruminantes *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis*. No Brasil, os próprios bovinos são considerados portadores naturais de *A. marginale* (ESTRADA-PENA et al., 2012), sendo nos bovinos a doença clínica mais notável em relação aos outros ruminantes. *A. centrale* é uma espécie menos patogênica em bovino quando comparada com *A. marginale*, e é extensivamente usada como vacina viva em várias regiões do mundo como Israel, Austrália, África e América do Sul. A infecção com *A. centrale*, em certas ocasiões, pode incorrer à doença clínica (KOCAN et al., 2010), porém é um evento de rara notificação (DREHER et al., 2005; HOFMANN-LEHMANN et al., 2004). A espécie *A. ovis* é parasita de ovinos e caprinos e não causa infecção persistente em bovinos. Já a infecção persistente com *A. marginale* pode ser estabelecida, além de nos bovinos, em outros ruminantes selvagens tais como mulas (*Odocoileus hemionus hemionus*), veados de cauda branca (*Odocoileus virginianus*), veados de cauda preta (*Odocoileus henzius columbianus*), antílopes (*Antilocapra americana*), carneiro (*Ovis canadensis canadensis*), Rocky Mountain Elkou (*Cervus elaphus nelsoni*) (ZAUGG et al., 1996; KUTTLER, 1984) e bisontes (*Bison bison*) (ZAUGG et al., 1996).

Bovinos que sobrevivem à infecção aguda permanecem persistentemente infectados, aparentemente saudáveis, apresentando níveis menores que 10^7 eritrócitos infectados por mL de sangue, o que é indetectável por análise com microscópio óptico (KOCAN et al., 1992a). Os níveis de *A. marginale* em animais persistentemente infectados flutuam e podem afetar a proporção de novos carrapatos que se tornam infectados. Em bovinos persistentemente infectados, níveis baixos de parasitemia (10^4), duram de 4 - 8 dias de cada ciclo replicativo que consistente de cinco semanas. Bovinos com níveis baixos de parasitemia são capazes de transmitir o agente para novos carrapatos numa percentagem de 27%, e os carrapatos por sua vez, de transmitir *Anaplasma* sp. mais eficientemente para bovinos susceptíveis quando adultos, do que quando ninfas. Elevados níveis de parasitemia (10^6) em bovinos persistentemente infectados resultam em um aumento da taxa de infecção em mais de 80% para carrapatos adultos e 50% em adultos expostos quando ninfas (ERIKS et al., 1993).

Como o tempo de vida dos eritrócitos é de aproximadamente 120 dias, para manutenção da infecção persistente os eritrócitos são reinfected continuamente através do processo de evasão da resposta imune, gerada pelas variantes antigênicas de *A. marginale* (KIESER et al., 1990). Portanto, bovinos persistentemente infectados além de raramente apresentarem sintomas pela segunda vez (RICHEY and PALMER, 1992), são importantes na epidemiologia tal como na propagação da anaplasmosse, pois como hospedeiros de *A. marginale* podem servir como fonte infecciosa pela propagação mecânica ou por transmissão biológica através do carrapato (KOCAN et al., 2010).

1.4 Taxonomia, morfologia e desenvolvimento

Desde a revisão taxonômica aceita em 2001 (DUMLER et al., 2001), os membros da ordem Rickettsiales foram reclassificados em duas famílias Anaplasmataceae e Rickettsiaceae. Segundo a análise das características biológicas e genéticas do rRNA 16S, groESL e genes de proteínas de superfície, considerou-se que o membro da família Rickettsiaceae engloba todas as bactérias intracelulares obrigatórias que crescem livremente no citosol da célula hospedeira, enquanto a família Anaplasmataceae compreende todas as bactérias intracelulares obrigatórias que crescem

e replicam-se dentro de vacúolos derivados de membrana da célula hospedeira (RIKIHISA, 1991). A família Anaplasmataceae (ordem Rickettiales) passou a ser composta por quatro gêneros com diferentes graus de similaridade: *Anaplasma* (96,1%), *Ehrlichia* (97,7%), *Wolbachia* (95,6%) e *Neorickettsia* (94,9%). Portanto, o gênero *Anaplasma* passou a conter além das espécies *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* e *A. ovis* as espécies *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys* e *Anaplasma bovis* anteriormente denominadas *Ehrlichias* (DUMLER et al., 2001).

Em 1908, Sir Arnold Theiler visualizou *A. marginale* pela primeira vez, através de análise microscópica de eritrócitos de bovinos africanos que manifestavam anemia aguda, como pontos à margem destes eritrócitos corados, denominando-se o termo “*marginale*”, e como sendo o agente microbiano da doença conhecida como “mal da bile” (THEILER, 1911; THEILER, 1910). Dois anos depois, este mesmo pesquisador isolou um microrganismo menos patogênico que *A. marginale*, designando-o como subespécie de *A. marginale*, *A. centrale* (THEILER, 1911), o qual devido a sua localização no centro dos eritrócitos infectados foi denominado o termo “*centrale*”. Theiler também concluiu após várias observações microscópicas com infecções puras e mistas com os dois patógenos, que a espécie *Anaplasma* não é um protozoário, pois se trata de parasitas intraeritrocíticos ausentes de membrana nuclear, contendo apenas cromatina e semelhantes às bactérias. Concluindo que, anaplasnose e babesiose são doenças diferentes, mas que podem coinfectar um mesmo animal, ao contrário do que Smith e Kilborne em 1893 haviam publicado por engano, descrevendo a espécie *A. marginale* como sendo o agente da febre do Texas e pertencente ao ciclo da *Babesia bigemina* devido aos múltiplos estádios distintos do parasita. No entanto, somente em 1926 que Darlington publicou um artigo sobre esta doença nos Estados Unidos, como sendo a mesma doença que Theiler havia chamado de mal da bile ou anaplasnose, caracterizada por febre e anemia, sucedida em bovinos geralmente durante as estações de verão e outono (KOCAN et al., 2010; PALMER, 2009).

O complexo ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* é coordenado com o ciclo de alimentação do carrapato adulto, macho *D. andersoni*, persistentemente infectado (KOCAN, 1992; KOCAN et al., 1992b). O carrapato adquire o patógeno durante a alimentação sanguínea em eritrócitos infectados. *Anaplasma* sp. desenvolve-

se no intestino e via hemolinfa pode invadir outras células do carrapato como ovário, túbulos de Malpighi, células musculares e células dos ácinos das glândulas salivares (KOCAN et al., 2004), caracterizando uma infecção generalizada a qual habilita o patógeno a se manter em carrapatos machos persistentemente infectados (GE et al., 1996). A cada sítio de infecção no carrapato, *A. marginale* desenvolve-se dentro de um vacúolo ou colônia ligado a membrana, formado devido a uma invaginação da membrana celular, caracterizando a primeira forma encontrada do seu desenvolvimento, a qual é denominada de forma vegetativa ou reticulada. Esta se divide por fissão binária dentro de uma colônia, e cada forma vegetativa pode conter de quatro a oito bactérias, as quais em uma infecção aguda podem estar presentes em 70% ou mais dos eritrócitos bovinos (KOCAN et al., 2003). As colônias aumentam de tamanho a cada replicação e em até 48 horas podem conter centenas de microrganismos. A partir da forma reticulada é gerada a forma densa ou infectiva que em três dias, apresenta um tamanho de 0,5 - 0,8 µm, caracterizada por ser uma forma mais arredondada e com distribuição mais uniforme de ribossomos em sua superfície. Esta forma pode sobreviver fora das células por um tempo determinado e capaz de iniciar um novo ciclo infeccioso quando transmitida através da glândula salivar do carrapato para um novo bovino (KOCAN et al., 2003).

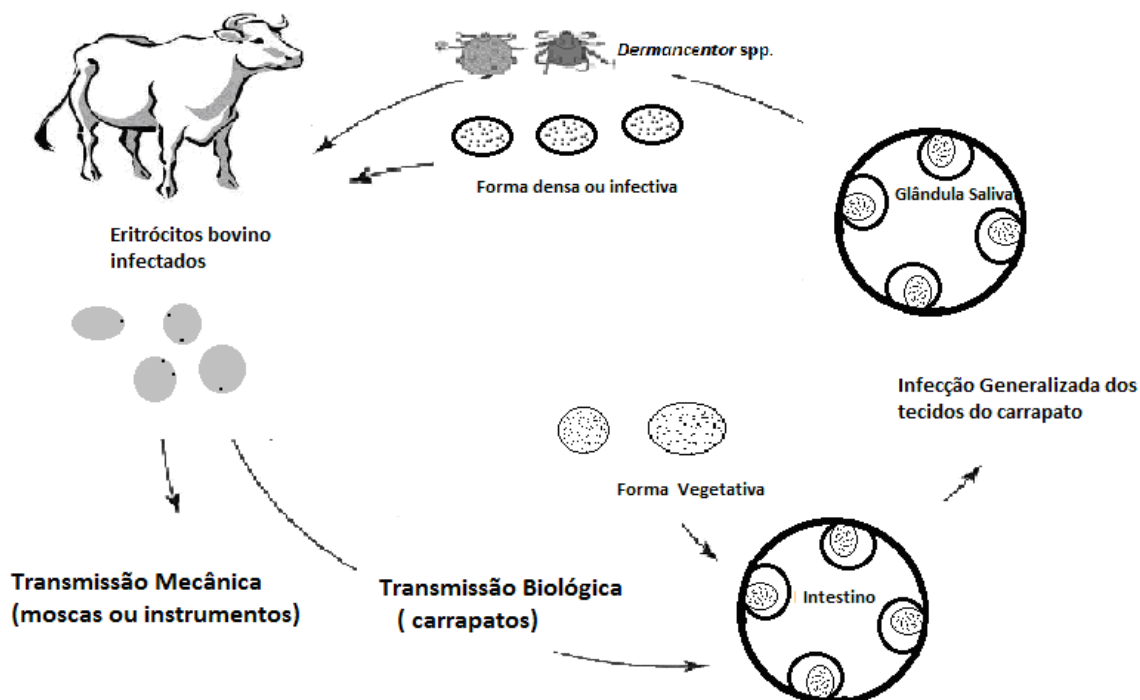


Figura adaptada de Kocan et al., 2003.

Figura 1. Ciclo de vida de *Anaplasma marginale* em bovinos e carrapatos. Eritrócitos infectados são ingeridos por carrapatos (*Dermacentor spp.*) através do repasto sanguíneo. O primeiro sítio de infecção no carrapato ocorre nas células do intestino, posteriormente outros tecidos são infectados assim como as células da glândula salivar, através da qual *Anaplasma sp.* é transmitida para novos bovinos susceptíveis. São visualizadas duas formas infectivas de *A. marginale* no carrapato. A primeira forma encontrada é a forma vegetativa ou reticulada que gera a segunda forma encontrada de *Anaplasma sp.* denominada de forma densa ou infectiva a qual consegue sobreviver fora da célula.

Em bovinos, aparentemente *A. marginale* infecta células endoteliais, as quais beneficiam a infecção célula a célula e a replicação dentro de eritrócitos maduros, de forma a servir como um local de proteção das células do sistema imune proporcionando um reservatório para novas infecções (MUNDERLOH et al., 2004). Entretanto, não se

sabe se *Anaplasma* sp. infecta primeiro as células endoteliais ou os eritrócitos, e quais seriam as possíveis implicações disto (RODRIGUEZ et al., 2009). A entrada de *A. marginale* nas células do bovino ocorre por endocitose dependente de moléculas de adesão expressas na membrana celular da bactéria, sua saída acontece no quarto dia por um processo controlado por ambas as membranas, externa e interna do eritrócito bovino. As membranas se fundem, rompendo esse complexo membranoso sem que haja extravasamento do conteúdo citoplasmático (KOCAN et al., 2004).

Em bovinos imunocompetentes *Anaplasma* sp. pode sobreviver e se multiplicar por no mínimo sete anos (KIESER et al., 1990) de modo que a infecção persistente é mantida através de variantes antigênicas geradas pelas proteínas de superfície MSP2 (DE LA FUENTE and KOCAN, 2001c) e MSP3 permitindo ao microrganismo evadir a resposta imune do hospedeiro (BRAYTON et al., 2005).

O estágio de desenvolvimento de *A. centrale* não foi descrito, porém UETI et al. (2007) demonstraram que a cepa vacinal aderiu, colonizou e replicou-se em células do epitélio intestinal e glândula salivar de *D. andersoni*, mesmo carecendo de toda a região repetida da MSP1a (SHKAP et al., 2002), porém sem efetiva transmissão para bovinos susceptíveis, mostrando que as regiões repetitivas N-terminais da MSP1a não são necessárias para entrada e colonização desta cepa dentro do carrapato (UETI et al., 2007).

1.5 Patologia e sinais clínicos

O período pré-patente da infecção por *A. marginale* é variável devido ao número de organismos infectantes, virulência da cepa (FARIAS, 1995) e a própria resistência natural do animal, variando de 7 a 60 dias com média de 28 dias (RISTIC and CARSON, 1977). Em bezerros, esse período também é influenciado quando os níveis de anticorpos colostrais diminuem e estes, por sua vez, entram em contato com o carrapato (PACHECO et al., 2004). Apresentam níveis de parasitemia superiores a 0,3% (ZAUGG et al., 1996), o qual é o menor nível de parasitemia no animal para que a transmissão por carrapatos seja eficiente (KIESER et al., 1990).

O pico de parasitemia varia de 2 a 13% com média de 7%, e ocorre de uma a quatro semanas após o aparecimento das primeiras hemácias parasitadas (RISTIC, 1960). No momento em que os eritrócitos infectados são detectados, o animal pode não apresentar qualquer sintoma clínico. O número de eritrócitos parasitados aumenta gradativamente devido à replicação do microrganismo, podendo alcançar níveis maiores que 70%. Após o estabelecimento do microrganismo nos eritrócitos é que os primeiros sinais clínicos da anaplasmosose começam a aparecer, normalmente entre 4 - 9 dias (RISTIC and CARSON, 1977). A temperatura acima de 40°C pode ocorrer antes da infecção de 1% dos eritrócitos e a temperatura acima de 41°C pode persistir por toda a parasitemia, com aumentos anormais detectados antes da morte do animal. O sinal mais grave da doença está associado à anemia leve ou acentuada devido à fagocitose dos eritrócitos infectados pelas células do sistema reticulo-endotelial bovina, especialmente células do sistema reticulo-endotelial do baço, por serem as células mais sensíveis no reconhecimento das anormalidades dos eritrócitos. As mucosas parecem ictéricas e a urina castanha devido ao aumento da concentração sérica dos pigmentos biliares, não ocorre hemoglobinemia e hemoglobinúria, os quais são sinais característicos de babesiose (KOCAN et al., 2004; KOCAN et al., 2003). Com a diminuição dos eritrócitos os animais tornam-se anoréxicos, fracos e depressivos, a produção do leite cai em vacas em lactação, e grávidas podem abortar assim como os touros podem desenvolver infertilidade temporária, além do observado aumento das taxas respiratórias, atonia ruminal associada à desidratação e perda de peso além da letargia, levando o animal à morte (KOCAN et al., 2010). Os animais podem se recuperar dentro de 1 - 4 dias depois dos primeiros sinais da doença caso a doença seja detectada e tratada corretamente neste período (RICHEY and PALMER, 1992).

Em animais com menos de seis meses de idade a doença é rara, animais entre um e dois anos de idade podem desenvolver a doença aguda, mas raramente ocorre óbito. Já os animais com mais de 6 meses de idade, por terem perdido a imunidade parcial gerada pelos anticorpos colostrais, apresentam níveis de anticorpos baixos os quais são insuficientes para controlar a bacteremia e geralmente animais com mais de 2 anos de idade desenvolvem a doença aguda ou hiperaguda com riscos de mortalidade entre 29% e 49% (KOCAN et al., 2003), podendo alcançar de 50% a 60% especialmente quando os bovinos se encontram estressados (KOCAN et al., 2010).

Enquanto para babesiose os bovinos da espécie *Bos indicus* são mais resistentes ao desenvolvimento da doença devido sua genética (AGUIRRE et al., 1988), para anaplasmose todas as raças de bovinos apresentam alto risco ao desenvolvimento da doença se expostos ao agente virulento de *A. marginale* (JONSSON et al., 2008). A taxa de mortalidade dos bovinos engloba número de vetores no ambiente, estado nutricional, o qual é um dos principais fatores estressantes em bezerros, de forma que, quando em período de desmama se evidencia perda de peso e maior suscetibilidade a doenças (OLIVEIRA et al., 2006).

1.6 Diagnósticos

As principais observações macroscópicas são sangue aquoso, mucosas ictericas, fígado e baço aumentado, rins aumentados e escuros, vesícula biliar distendida com bile densa, grumosa e congestão cerebral. Entretanto, com a diversidade de virulência da cepa de *A. marginale* e a susceptibilidade do hospedeiro, os sinais clínicos podem variar e um diagnóstico laboratorial mais detalhado para identificação do agente é necessário (FARIAS, 1995).

Anaplasmose muitas vezes é confundida com babesiose pelos sintomas clínicos, dessa forma é necessário teste de diagnóstico que confirme a presença do parasita. No método de esfregaço sanguíneo *Babesia* sp. é maior e encontra-se localizada mais periféricamente que *A. marginale* (DE LA FUENTE and KOCAN, 2001c). O padrão ouro para detecção de *A. marginale* seria a subinoculação do sangue de um animal infectado em um bezerro esplenectomizado (COETZEE and APLEY, 2006; COETZEE et al., 2006). Entretanto, é um método caro, demorado e gera questões de bem-estar animal, já que os bezerros tornam-se muito doentes depois da subinoculação do sangue infectado e, muitas vezes devem ser sacrificados (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) 2008). Assim, como método alternativo, tão sensível quanto às subinoculações é o cultivo celular, mas também requer tempo prolongado para a conclusão do diagnóstico (BOSE et al., 1995). Dessa forma, testes têm sido validados utilizando a detecção microscópica de *A. marginale* em comparação com outros

resultados sorológicos, da mesma forma que o teste de ELISA foi validado com a utilização da PCR e a qual ainda não foi validada (VIDOTTO e MARANA, 2001).

1.6.1 Diagnósticos diretos

Durante a fase aguda da anaplasiose, altos níveis de parasitemia são facilmente visualizados pelo método de esfregaço sanguíneo. Os eritrócitos infectados são corados por corantes hematológicos convencionais (Giemsa, Wright, May-Grunwald), ou corantes rápidos comerciais (Instant Prove e Panótico Rápido LB) e visualizados sob o microscópio óptico. *A. marginale* pode ser visualizada como formas arredondadas normalmente próximas à membrana dos eritrócitos infectados (MARCELINO et al., 2012). *A. centrale* pode estar situada a partir da margem dos eritrócitos infectados, possuindo aparência semelhante, sendo difícil a diferenciação destas duas espécies por este método, ainda mais quando se trata de bovinos persistentemente infectados (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) 2008). Neste sentido, a hibridização por sondas de DNA ou RNA, e o método de PCR são altamente sensíveis para a detecção e diferenciação de *Anaplasma* spp. (FARIAS, 1995).

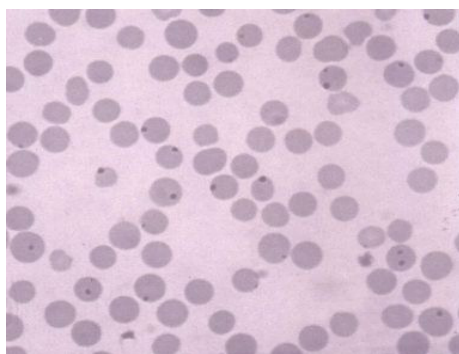


Figura 2. *A. marginale* em eritrócitos circulantes

Foto: J.R. Martins

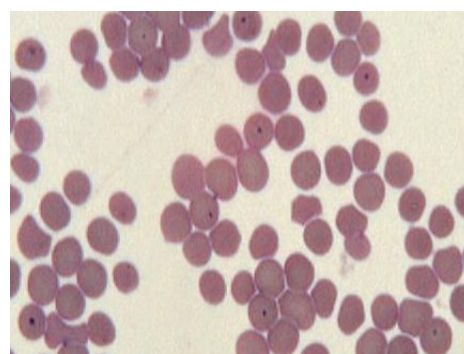


Figura 3. *A. centrale* em eritrócitos circulantes

Foto: J.R. Martins.

As sondas de RNA são desenvolvidas para detectar e quantificar níveis não detectáveis do DNA da *Anaplasma* sp. em eritrócitos de bovinos portadores e carrapatos infectados. A sensibilidade é de 0,01 ng de DNA, de 500 a 1.000 eritrócitos infectados em 0,5 mL de sangue, o que equivale a uma parasitemia de 0,000025%, portanto 4.000 vezes mais sensível que o método de esfregaço sanguíneo (ERIKS et al., 1993).

A sensibilidade da PCR é equivalente a 0,0001% de parasitemia (HOPE et al., 2004), e a *nested* PCR (nPCR), possui sensibilidade de 30 eritrócitos infectados por microlitro de sangue, o equivalente a 0,0000001% de parasitemia (TORIONI DE et al., 1998), correspondente a um aumento de 10 a 100 vezes na sensibilidade com relação ao teste de PCR convencional e sonda de RNA descritas por GE et al. (1995) e ERIKS et al. (1989). A especificidade da reação também pode ser alta, já que o projeto dos *primers* é realizado segundo uma região conservada do genoma, detectando o agente dentro de uma família, gênero ou espécie específica (VILJOEN, NEL and CROWTHER, 2005).

1.6.2 Diagnósticos indiretos

Os testes sorológicos demonstram uma boa sensibilidade em animais portadores, dentre eles estão os testes imunoenzimáticos de ELISA direto, indireto e competitivo, Western-blot e o teste do cartão. Atualmente, os testes sorológicos mais utilizados para a identificação de animais infectados com *A. marginale* são os teste de ELISA e o teste de cartão (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) 2008).

Geralmente o teste de ELISA apresenta sensibilidade limitada em infecções iniciais, reação cruzada com outras espécies e baixa especificidade para detectar bovinos verdadeiramente negativos (AUBRY and GEALE, 2011). Porém, já foi relatado apresentar sensibilidade de 93% e especificidade de 96%, sem apresentar reações cruzadas com *B. bovis* ou *B. bigemina* (MONTENEGRO-JAMES et al., 1990). O teste de ELISA competitivo utiliza anticorpo monoclonal (Mab) específico para a proteína MSP5 (ANAF16C1), apresenta alta sensibilidade e especificidade, podendo detectar *Anaplasma* spp. em animais infectados e persistentemente infectados

(TORIONI DE et al., 1998), no entanto, não pode diferenciar as espécies de *Anaplasma* (VISSER et al., 1992).

O Western-Blot é outro teste imunoenzimático que pode detectar a infecção por *A. marginale* em poucos dias após a exposição ao agente, podendo ser empregado em casos de animais com infecção aguda ou crônica (KWAK and SMITH, 1989), mas também não diferencia entre as espécies de *Anaplasma*.

Dentre as provas de aglutinação presentes, estão a aglutinação em tubo capilar, aglutinação rápida e congutinação rápida ou teste do cartão. São muito utilizadas como prova de campo por serem rápidas e sensíveis (MOLLOY et al., 1999), ainda mais, após ter incluído o fator sérico bovino como controle negativo aumentando a sensibilidade na detecção de anticorpos contra o patógeno (KUTTLER, 1975). Dessa forma, apresenta reações inespecíficas e os resultados são variáveis de lote para lote e de laboratório para laboratório (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) 2012).

1.7 Imunidade contra *A. marginale*

Como *A. marginale* não replica dentro de células que expressam em sua superfície antígenos da classe I do complexo de histocompatibilidade principal (MHC I) e estrutura de processamento de antígeno (MADRUGA, ARAÚJO e SOARES, 2001), a resposta imune protetora contra a *Anaplasma* sp. requer a ativação tanto das células T CD4⁺ quanto de anticorpos (PALMER et al., 1999). As células T CD4⁺ ativadas pelo antígeno são fundamentais para aumentar o estímulo da produção de IgG2 através da secreção de IFN- γ (BROWN et al., 1998; ESTES et al., 1994) de forma que também estimula a expressão do receptor Fc exclusivo de macrófagos de bovino o qual se liga apenas a IgG2 facilitando a fagocitose (TIZARD, 2002). *In vitro*, tanto IgG1 quanto IgG2 são capazes de se ligar a macrófagos ativos, mas apenas IgG2 opsonizam monócitos e neutrófilos, sendo possível que esta classe seja a mais importante no processo de fagocitose desse patógeno *in vivo* (BROWN et al., 1998). Os anticorpos participam da resposta imune contra *A. marginale* de duas formas: neutralizando as bactérias extracelulares de forma a impedir que elas se fixem e penetrem em novos

eritrócitos (MCGAREY and ALLRED, 1994), e opsonizando os antígenos expressos na superfície da célula infectada para as células T CD4+ ativar os macrófagos através da secreção de IFN- γ a produzir moléculas bactericidas, tais como óxido nítrico (NO) (BROWN et al., 1998). O óxido nítrico sozinho não é tóxico para a bactéria, mas, os produtos gerados através da reação com o ânion superóxido são muito tóxicos. Dessa forma, a eliminação contínua do óxido nítrico pelos macrófagos permite a eliminação eficiente de vários microrganismos (TIZARD, 2002). Esta é a maneira mais eficiente de eliminação de bactérias intracelulares obrigatórias que não podem ser alvos diretos do MHC I (PALMER et al., 1999).

A imunidade contra *Anaplasma* sp. depende do perfil da especificidade dos anticorpos produzidos. No entanto, não existe correlação entre o título de anticorpo e o nível de proteção, exceto em animais jovens, nos quais mesmo títulos baixos podem conferir proteção (MOREL, 1989).

Os bovinos apresentam uma forte resposta de IgG1 e IgG2 que varia ao longo do curso da infecção aguda e persistente, sendo os títulos de anticorpos mantidos entre 3.000 e 100.000 durante a infecção persistente (PALMER et al., 1994; TEBELE et al., 1991). A resposta de anticorpos é direcionada especialmente contra a proteína de membrana externa imunodominante e antigenicamente variável, MSP2 (LOPEZ et al., 2005; PALMER et al., 1994) embora outras MSPs tais como as MSP3 antigenicamente variável a qual compartilha a parte C-terminal conservada da proteína MSP2, a MSP1, MSP4 e MSP5 também podem ser detectadas em testes de imunomarcações (PALMER et al., 1999; TEBELE et al., 1991). As MSPs são proteínas facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro e demonstram importantes funções para a sobrevivência, replicação e transmissão do parasito, de forma que essas proteínas expressas na superfície do patógeno são consideradas candidatas ao desenvolvimento de vacina alvo para a indução de resposta imune protetora no hospedeiro vertebrado e ou prevenção da colonização no vetor (NOH et al., 2008).

O processo de evasão de *Anaplasma* sp. contra resposta imune do hospedeiro durante uma infecção persistente está relacionada com a desregulação dos mecanismos de defesa inato e adaptativo do hospedeiro. *A. marginale* evoluiu mecanismos únicos

para persistir no eritrócito bovino, perdeu genes que codificam lipopolissacarídeos (LPS) e peptidoglicanos (PGN), ativadores dos mecanismos de defesa celular, os genes que codificam as proteínas de superfície variam extensivamente, principalmente os genes da MSP2, além de secretar fatores de virulência através do sistema de secreção do tipo IV (TFSS ou T4SS) (BROWN, 2012).

1.8 Proteínas de superfície principal de *A. marginale*

As proteínas de superfície de *A. marginale* (MSPs) estão envolvidas nas interações com hospedeiros vertebrados e invertebrados. Devido à forte pressão seletiva exercida pela resposta imune do hospedeiro, as MSPs evoluem rapidamente (DE LA FUENTE et al., 2001a; DE LA FUENTE et al., 2001b), sendo atualmente o principal foco para o desenvolvimento de vacinas (PALMER et al., 1999). MSPs são conservadas tanto em eritrócitos bovinos quanto em células de carrapatos (BARBET et al., 1999), podem estar presentes de duas formas no parasita, expressas na membrana externa de corpúsculos ou como componentes solúveis são secretadas sob a forma de vesículas ou bolhas na membrana destes corpos servindo como fatores de virulência para a bactéria (DE LA FUENTE et al., 2001a; LEAL et al., 2000).

Inicialmente foram detectadas seis MSPs na membrana dos corpúsculos de *A. marginale*: MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5 (BARBET et al., 1987; OBERLE et al., 1993; PALMER and MCGUIRE, 1984). Destas proteínas a MSP1b, MSP2 e MSP3 são codificadas por famílias multigênicas, resultando na expressão de cópias polimórficas, e as MSP1a, MSP4 e MSP5 são codificadas por um único gene, sendo conservadas entre diferentes amostras do agente (PALMER et al., 1999).

Superfamília MSP1

A MSP1 é formada por um complexo de MSP1a e MSP1b ligados por pontes de dissulfeto. A MSP1a é codificada pelo gene *msp1 α* presente em cópia única, apresenta variação de tamanho molecular de 60 a 105 kDa em diferentes regiões geográficas devido aos 28 - 31 aminoácidos que se repetem em tandem de duas a oito vezes, os

quais estão localizados na porção amino (N-) terminal da proteína (DE LA FUENTE et al., 2003; DE LA FUENTE et al., 2002; DE LA FUENTE et al., 2001; DE LA FUENTE et al., 2001a; ALLRED et al., 1990), além de induzir uma forte resposta de células T e neutralização por células B devido à existência de epítomos sensíveis nesta região conservada da proteína (DE LA FUENTE et al., 2004; GARCIA-GARCIA et al., 2004; KOCAN et al., 2003).

Ambas as regiões amino (N-) e carboxi (C-) terminais da porção MSP1a são glicosiladas, também, em particular a região N-terminal desta proteína apresenta 25 sítios de O-glicosilação (DE LA FUENTE et al., 2003; DE LA FUENTE et al., 2002). A função biológica da glicosilação de MSP1a e MSP1b são desconhecidas, mas os resíduos de carboidratos encontrados na região glicosilada podem contribuir na propriedade de adesão das membranas, assim como a glicosilação pode funcionar como uma proteção contra proteases durante o desenvolvimento das proteínas de membranas, contribuindo para a variação antigênica e fenotípica do patógeno (KOCAN, DE LA FUENTE and BLOUIN, 2008) a fim de conseguir se aderir e infectar a célula hospedeira.

A função biológica da MSP1a é servir de adesina para ajudar na invasão e transmissão de algumas cepas de *Anaplasma* sp. aos eritrócitos bovinos e células de carrapato (DE LA FUENTE et al., 2001a). É um exemplo de proteína relacionada com a interação patógeno-hospedeiro (BROWN et al., 2001), estando amplamente distribuídas entre os isolados brasileiros de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Pernambuco (KANO et al., 2002).

A MSP1b é codificada por uma família multigênica, composta por cinco membros, dos quais dois são completos (*m*sp1 β 1 e *m*sp1 β 2) e três incompletos ou parciais (*pg*) (*m*sp1 β pg1, *m*sp1 β pg2 e *m*sp1 β pg3) (VISESHAKUL et al., 2000), considerados como prováveis pseudogenes funcionais, os quais permitem a variação antigênica de MSP1b (BRAYTON et al., 2005). MSP1b é codificada pelos genes *m*sp1 β 1 e *m*sp1 β 2, os quais mantêm-se conservados durante a replicação bacteriana, porém apresenta pequenas variações devido ao processo de recombinação e seleção de sub-populações (BOWIE et al., 2002). É uma proteína polimórfica entre os isolados brasileiros e apresenta variações de tamanho de 100 - 105 kDa (OBERLE et al., 1988), a

qual forma um complexo com a proteína MSP1a, apresentando papel de adesão apenas para eritrócitos bovinos e não para células de carrapatos (DE LA FUENTE et al., 2001a).

Superfamília MSP2

A MSP2 é uma proteína imunodominante de superfície com tamanho de 36 kDa (KOCAN et al., 2002). É codificada por uma família de genes polimórficos (PALMER et al., 1994), apresenta uma região central hipervariável que se estende do aminoácido 180 ao aminoácido 275. É flanqueada por regiões N- e C-terminais altamente conservadas (FRENCH et al., 1998) e ocorre como monômeros ou multímeros ligados por pontes de dissulfeto (VIDOTTO et al., 1994). A MSP2 é expressa tanto na parasitemia aguda quanto na crônica, e sua expressão seletiva ocorre logo na glândula salivar do carrapato, sendo que nas primeiras 48 horas após a alimentação é expressa no intestino médio do carrapato (LOHR et al., 2002). Durante o ciclo de parasitemia a MSP2 exibe múltiplas variantes antigênicas devido a inserções, deleções e substituições de aminoácidos (KOCAN et al., 2001), as quais induzem anticorpos específicos para essa região altamente variável durante a infecção persistente (FRENCH et al., 1998). Os pseudogenes ou alelos doadores de *mSP2* possuem uma região central hipervariável flanqueada por regiões altamente conservadas 5' e 3', sua recombinação dentro de um sítio de expressão funcional gera novas variantes responsáveis pela evasão da resposta imune (BRAYTON et al., 2001). A variabilidade gênica é gerada pelo rearranjo de mais que 10 pseudogenes funcionais inteiros em um único sítio de expressão gênica (BRAYTON et al., 2005; BRAYTON et al., 2001), neste contexto, distintas configurações aumentam exponencialmente devido à conversão de segmentos gênicos, nos quais vários sítios de expressão são gerados pela recombinação de segmentos de oligonucleotídeos dos alelos doadores (PALMER et al., 2009a). Foi sugerido que as variações genotípicas não são geradas rapidamente em um animal, já que um único genótipo foi identificado em um animal num período de dois anos, porém em áreas endêmicas, uma grande variedade antigênica dentro de um rebanho foi encontrada (PALMER et al., 2001).

A MSP2 está presente em isolados de diversas regiões brasileiras tais como Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul, identificados pelo anticorpo monoclonal ANAF19E2 (KANO et al., 2002), e nas regiões de Mato Grosso do Sul e Pernambuco identificados pelo anticorpo monoclonal ANAO50A2, ANAO58A2, ANAO66A2 e ANAO70A2 (OLIVEIRA et al., 2003).

MSP3

MSP3 é uma família de proteína imunodominante multigênica, conhecida anteriormente como AM86 (PALMER et al., 1986). Devido a região central hipervariável apresenta uma grande variação de 543 pb, com tamanhos de 65 – 86 kDa em diferentes regiões. Variáveis antigenicamente são geradas a partir de pseudogenes inteiros, os quais se recombina dentro de um sítio único de expressão e entre os isolados de diferentes regiões geográficas (KOCAN et al., 2003), servindo para evadir a resposta imune do hospedeiro durante a infecção aguda e persistente (MEEUS et al., 2003). Entre os isolados brasileiros apenas o isolado de Minas Gerais apresenta o epítipo para a porção MSP3 a partir dos anticorpos monoclonais AMG75C2 e AMG76B1 (MEEUS et al., 2003; KANO et al., 2002). Há um sítio de expressão completo para *mSP3* com sete pseudogenes funcionais, os quais são determinados como cópias de genes truncados que são expressos como parte de uma proteína funcional completa, após a recombinação num único sítio de expressão. Dessa forma, embora definido como cópias inativas sua funcionalidade continua a ser determinada (BRAYTON et al., 2005). O sítio *mSP3* codifica blocos de aminoácidos relacionados com a família multigênica *mSP2* (BRAYTON et al., 2005; ALLEMAN et al., 1997). Apenas o sítio de *mSP3* codifica a proteína completa, sendo a região C-terminal, compartilhada com a MSP2. Após o evento de duplicação original é que os genes *mSP2* e *mSP3* se divergem, originando proteínas antigenicamente diferentes de 40 e 80 kDa (MEEUS et al., 2003). Na região variável N-terminal da MSP3 existe pelo menos um epítipo conservado da MSP2, e na região N-terminal de MSP2 existe sequências de aminoácidos conservadas que são idênticas às sequências de aminoácidos da MSP3 (MEEUS et al., 2003).

MSP4

Esta proteína tem sido usada para caracterizar diversidade genética de *Anaplasma* spp. (DE LA FUENTE et al., 2004). Por se tratar de uma proteína conservada antigenicamente e estruturalmente, está presente em diferentes isolados de *A. marginale*, tais como nos isolados brasileiros do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Pernambuco (KANO et al., 2002) e em isolados de *A. centrale* (OBERLE et al., 1993). A MSP4 está presente na membrana externa e interna da bactéria, apresenta tamanho de 31 kDa, e é codificada por um gene de cópia única (KOCAN et al., 2002; OBERLE et al., 1993). Sua função biológica é desconhecida, mas são proteínas que exercem pressão seletiva no sistema imune do hospedeiro e por isso estão envolvidas na interação patógeno-hospedeiro (KOCAN et al., 2003).

MSP5

É uma proteína com massa molecular de 19 kDa, conservada entre os isolados de *A. marginale*, *A. centrale* e *A. ovis*, codificada por um gene de cópia única (VISSER et al., 1992). A MSP5 foi detectada nos isolados brasileiros de Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e Pernambuco de *A. marginale* (KANO et al., 2002).

Por possuir um epítipo imunodominante altamente conservado entre diferentes espécies de *Anaplasma*, o qual é detectado pelo anticorpo monoclonal ANAF16C, a MSP5 é utilizada como antígeno para a elaboração de ELISAs para o diagnóstico de *A. marginale* (VISSER et al., 1992).

1.9 Outras proteínas de membrana

Novas proteínas foram detectadas através da separação eletroforética bidimensional da membrana externa da bactéria e análise por espectrometria de massas das proteínas que reagiram com IgG1 e IgG2 de bovinos imunizados com a membrana de *A. marginale*. Foram sequenciadas sete proteínas que não puderam ser identificadas a

partir de pesquisas no BLAST para identificar sequências homólogas em outros microrganismos. As sequências AM197 e AM854 tiveram identidade com prováveis proteínas em *Ehrlichia canis*, a sequência AM127, teve identidade com a proteína hipotética em *Ehrlichia chaffeensis*, enquanto as sequências AM072, AM366, AM387, e AM529 não tiveram similaridade de sequência com qualquer proteína identificada até o momento (LOPEZ et al., 2005).

No genoma de *A. marginale*, isolado de Sta Maries, foi identificado o sistema de secreção tipo IV (T4SS ou TFSS, do inglês, *Type IV secretion system*) cuja organização é semelhante a que foi descrita em *Anaplasma phagocytophilum* e *E. chaffeensis*, com um operon contendo *sodB*, *virB3*, *virB4* e *virB6* e outro mais distante contendo *virB8*, *virB9*, *virB10*, *virB11* e *virD4* (OHASHI et al., 1998).

Em *A. phagocytophilum* o T4SS é um fator de virulência os quais secretam proteínas efetoras tais como anquirina, proteína que contém domínios repetidos de ankyrina (AnkA). Estas proteínas secretadas possuem distintos mecanismos de sinalização que podem ter papel na ligação e invasão da célula hospedeira (NIU et al., 2010; RIKIHISA et al., 2010). Em *A. marginale* a função do T4SS ainda não foi determinada, mas sugere-se que a retenção deste gene num organismo patogênico tão pequeno, indica seu requerimento para a invasão e sobrevivência dentro do eritrócito bovino e células do carrapato (BRAYTON et al., 2005).

1.10 Imunização

A imunidade protetora contra a anaplasnose bovina é desenvolvida após a recuperação da infecção aguda natural ou pela imunização com organismos vivos ou mortos, frações de membrana ou com proteínas de superfície purificadas, que apresentam epítomos apropriados para células B e T (TEBELE et al., 1991). Atualmente existem tratamentos quimioterápicos e controle de vetores, mesmo assim a vacinação é o meio mais seguro e eficaz de controle da anaplasnose bovina em todo o mundo (PALMER et al., 1999). Todos os tipos de vacina utilizados até o momento reduzem ou previnem os sinais clínicos da doença, porém não previnem que os animais tornem-se persistentemente infectados com *A. marginale*.

Imunizações com organismos vivos foram iniciadas por Sir Arnold Theiler (1910) e continuam sendo o método de escolha em muitas regiões do mundo (KOCAN et al., 2003; THEILER, 1911). O processo de imunização consiste da inoculação de eritrócitos parasitados com o microrganismo menos patogênico, *A. centrale* em bovinos (KOCAN et al., 2003). A isoeritrólise neonatal pode ocorrer quando bezerros ingerem colostro de vacas com altos títulos de anticorpos de forma que vacas sensibilizadas transferem isoanticorpos aos neonatos, causando elevada mortalidade (ROGERS et al., 1988). Assim, é sugerido que os animais imunizados sejam acompanhados por um médico veterinário a fim de evitar futuras perdas (BENAVIDES et al., 2000).

A imunização com a cepa viva de *A. marginale* requer o monitoramento constante dos animais vacinados e tratamento com baixas doses do fármaco tetraciclina aos primeiros sinais da doença clínica. Essa estratégia de vacinação é conhecida também como método de infecção x tratamento ou premunicação, no qual o animal torna-se persistentemente infectado, tem custos elevados e muitas vezes tornam-se impraticáveis quando todo um rebanho deve ser vacinado (KOCAN et al., 2003).

Cepas atenuadas (RISTIC et al., 1968) também têm sido avaliadas como vacinas vivas contra anaplasnose bovina. As cepas são selecionadas após passagens seriadas em cervídeos ou ovelhas ou mesmo submetidas à exposição à radiação por Cobalto (^{60}Co) (RISTIC et al., 1968), não sendo sugerida sua utilização em animais com mais de um ano, devido ao risco de a cepa se tornar virulenta (KOCAN et al., 2003). Sendo assim, animais vacinados com o organismo atenuado também devem ser acompanhados por um médico veterinário a fim de evitar futuras perdas (BENAVIDES et al., 2000). Atualmente o método mais eficiente de indução de imunidade protetora contra anaplasnose é por meio de imunização com vacina viva de *A. centrale* (BROWN, 2012), pois compartilha com *A. marginale* epítomos responsáveis pela resposta imune protetora, dentre os quais, estão os epítomos para linfócitos T CD4+ (SHKAP et al., 2002), embora, possa causar eventualmente, doença clínica em bovinos adultos e falha na proteção contra cepas muito virulentas de *A. marginale* (BRIZUELA et al., 1998; POTGIETER and VAN, 1982).

As vacinas com antígenos mortos ou inativados foram desenvolvidas inicialmente nos Estados Unidos na década de 60 (BROCK, 1965), e apesar de possuírem algumas vantagens perante as vacinas vivas, não são utilizadas com frequência devido à

necessidade de inoculações anuais, o alto custo na purificação de *Anaplasma* sp. a partir de eritrócitos bovino e a falta de proteção cruzada entre isolados de diferentes regiões, além de a proteção ser menor que a induzida pela vacina viva. As vantagens deste método são devido ao baixo número de organismos infecciosos veiculados pelo sangue, o armazenamento barato, e o fato de as reações pós-inoculação apresentarem mínima relevância clínica (BROCK, 1965).

Devido à técnica de DNA recombinante, com enfoque nas proteínas de superfície de *A. marginale*, e ao sucesso no cultivo *in vitro* deste patógeno em células de carrapato, novas perspectivas surgiram quanto ao desenvolvimento de novas e mais eficientes vacinas contra este patógeno (ARAÚJO et al., 2003). Em vários estudos com *A. marginale*, a imunização de bovinos com proteínas de membrana externa purificada, induziu proteção contra níveis elevados de parasitemia e a doença clínica (BARBET et al., 2000). No entanto, nenhuma das proteínas individuais induziu proteção equivalente à do complexo de membranas externas (BARBET et al., 2000; ABDALA et al., 1990), no qual a proteção é associada a elevados títulos de IgG2 e linfócitos T CD4 + contra as MSPs (BARBET et al., 2000). Da mesma forma, não foi eficiente a proteção contra altos níveis de bacteremia e anaplasnose clínica, mesmo apresentando uma rápida resposta humoral, quando foi produzida a vacina de *A. centrale* em células de carrapato IDE8 (LASMAR et al., 2012).

1.11 Vacina viva de *A. centrale*

A partir de observações, Theiler relatou que um animal pode ser inoculado mais de uma vez com *A. centrale* correndo o risco de desenvolver uma leve reação devido a uma diferença na cepa de *Anaplasma* sp., porém a primeira infecção daria imunidade suficiente para proteger o animal. Essas informações serviram de base para o desenvolvimento da vacina de *A. centrale* (THEILER, 1912; THEILER, 1911).

A. centrale é uma espécie de bactéria menos patogênica para bovinos em relação a *A. marginale*. Foi importada da África em 1934, local onde originalmente foi isolada em 1911 (THEILER, 1911). *A. centrale* devido ao fato de relativamente não ser transmitida por *R. microplus*, é utilizada como vacina há mais de 100 anos (BOCK and

DE VOS, 2001) em vários países do mundo como Austrália, África do Sul, Israel, Paraguai, Uruguai, Argentina, Brasil, e mais recentemente em Zimbábue e Malawi como uma vacina heteróloga, a qual induz uma proteção contra anaplasiose clínica prevenindo a morte. No Brasil, foi padronizada pela Embrapa (KESSLER et al., 2002), e veterinários a utilizam extensivamente para a prevenção de surtos de anaplasiose bovina em condições de campo. A vacina deve ser administrada preferencialmente via intramuscular ou subcutânea, por serem além de vias de fácil aplicação também apresentam um bom desempenho (BOCK and DE VOS, 2001). A vacina desenvolve infecção persistente semelhante às variações antigênicas descritas em *A. marginale* (SHKAP et al., 2002) e neste caso não há necessidade de revacinações (TEBELE et al., 1991; ABDALA et al., 1990; RISTIC and CARSON, 1977). A imunidade parcial é gerada dentro de 6 - 8 semanas, sendo detectados níveis de anticorpos para *A. centrale* em até nove anos após a vacinação, os quais não apresentaram diminuição aparente em testes de sensibilidade (MOLLOY et al., 2001). A imunidade protetora gerada contra a cepa virulenta de *A. marginale* não impede a infecção, mas previne a morte devido à presença de epítomos imunodominantes semelhantes entre as duas espécies, tais como os epítomos de células T CD4+ (SHKAP et al., 1991). Estudos revelaram que a imunidade protetora está correlacionada com a ligação dos anticorpos IgG2 às proteínas de superfície principais (PALMER et al., 1999; BROWN et al., 1998). A imunização com a cepa vacinal induz a expressão de IgG2, os quais se ligam ao conjunto de proteínas de superfície da cepa virulenta, independente das variações existentes entre as cepas de *A. centrale* e *A. marginale*, as quais são de 60% a 84%, exceto nas variantes MSP2 e MSP3, e protege contra níveis elevados de bacteremia e doença. Contudo, a base da imunidade protetora contra a cepa virulenta ainda permanece desconhecida (AGNES et al., 2011). Embora a cepa vacinal não induza a produção de anticorpos para a MSP1, proteína consistente com diferenças estruturais de *A. marginale* (HERNDON et al., 2010), também não induz níveis de anticorpos relevantes para as proteínas conservadas MSP4 e MSP5 em desafio contra a cepa Sta. Maries de *A. marginale* (MOLAD et al., 2004). Mesmo assim é sugerido que a ausência de anticorpos para MSP1 reflita na baixa imunogenicidade no contexto da vacinação com *A. centrale* (AGNES et al., 2011).

A vacina de *A. centrale* não é licenciada nos Estados Unidos e União Européia, devido ao fato de ser uma vacina viva, produzida a partir do sangue de bovinos, os quais

podem transmitir patógenos contaminantes conhecidos e não conhecidos através da vacina (ROGERS et al., 1988). Adicionalmente, a vacina não induz imunidade uniforme contra as cepas de *A. marginale* isoladas de diferentes regiões, e surtos foram relatados em animais vacinados (BOCK and DE VOS, 2001). Entretanto, nesse mesmo estudo os autores mostraram que apesar de a resposta de bovinos vacinados terem sido variadas nas diferentes regiões de uso extensivo, a proteção contra *A. marginale* foi adequada para prevenir a doença clínica na maioria dos casos, pois embora existam cepas de *A. marginale* altamente virulentas e diferentes antigenicamente por toda parte do mundo, são os bovinos quem devem apresentar habilidade em montar uma resposta imune protetora contra a diversidade de *A. marginale* mesmo quando imunizados com a vacina de *A. centrale*. Bovinos adultos sem exposição prévia com o patógeno são bovinos altamente susceptíveis a desenvolver a doença clínica, mesmo quando é inoculada uma cepa de baixa virulência (LASMAR et al., 2012). Alguns isolados de *A. marginale* da África e América do Sul são resistentes à imunidade produzida por *A. centrale*, e neste caso, uma cepa denominada 'Dawn' (isolada na Austrália em 1991), cepa menos patogênica que *A. marginale* é utilizada. Nestas regiões, a cepa 'Dawn' é mais eficiente que a cepa *A. centrale* (BOCK and DE VOS, 2001), mostrando ser protetora contra desafios heterólogos com cepas australianas (BOCK et al., 2003). Isolados de *A. marginale* derivados de búfalos são menos patogênicos que *A. centrale*, porém apresentam uma proteção menos eficiente contra desafio com cepas virulentas de *A. marginale* (POTGIETER and VAN, 1983).

O controle da anaplasmoze bovina deve ser feito em sentido profilático, evitando o desenvolvimento da doença, pois o tratamento quimioterápico, quando se trata de um número grande de animais é mais caro e nem sempre eficaz (SACCO, 2001). É recomendado vacinar animais sensíveis, passíveis de adoecer, animais de áreas livres e de instabilidade enzoótica. Em áreas endêmicas é importante que os bezerros entrem em contato com os carrapatos para que se tornem imunes naturalmente. Recomenda-se vacinar bezerros de 6 - 9 meses de vida, nesta idade, os riscos de reações com a vacina são mínimos, e a vacinação irá prevenir fortemente a doença exibindo uma proteção duradoura (BOCK and DE VOS, 2001). O inóculo de *A. centrale* é padronizado e por se tratar de microrganismos vivos há o desenvolvimento de uma infecção subclínica, que não requer tratamento, entretanto pode desenvolver leves alterações nos valores

sanguíneos e hipertermia. Portanto, não é recomendada a imunização de vacas gestantes e nem de animais adultos (SACCO, 2001). No caso de transporte do animal, deve-se observar sua origem, de área endêmica ou não endêmica, e a raça. Neste caso, o requerimento de vacinação pode ser uma medida de segurança nas propriedades para a identificação de bovinos vacinados e aceitos para exportação (BOCK and DE VOS, 2001).

1.12 Controle de qualidade da vacina de *A. centrale*

A vacina é produzida em bezerros esplenectomizados, para garantir o rendimento máximo da produção da vacina, mantidos em quarentena. Devido à vacina ser fornecida congelada, seu transporte é dificultado já que a cepa deve ser mantida em nitrogênio líquido. Seu controle de qualidade é de extrema importância visto que outros organismos presentes no sangue do bovino podem contaminar a vacina e serem disseminados de forma ampla (BOCK et al., 2003).

Segundo autoridades veterinárias, as quais disponibilizam os requisitos processuais específicos para aprovação ou licenciamento dos produtos biológicos de uso veterinário, as análises de risco para vacinas veterinárias são estabelecidas sob os princípios de garantia de qualidade, que incluem o risco relacionado com a contaminação das mesmas por agentes infecciosos (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) 2008).

Se o bezerro doador estiver infectado com *A. marginale*, pode ser observado no esfregaço do bezerro esplenectomizado geralmente dentro quatro semanas, período no qual as hemácias começam a ser parasitadas, mas podem se estender até oito semanas, dependendo da cepa de *A. marginale*. Animais que apresentam baixos níveis de parasitemia, além de ser clinicamente saudáveis são de difícil detecção microscópica e servem como portadores infecciosos para uma contínua transmissão do agente patogênico. Sendo assim, a contaminação da vacina de *A. centrale* com *A. marginale*, principalmente por insetos hematófagos, é um risco durante todo o seu processo de produção. Como *A. marginale* é mais virulenta que *A. centrale*, sua contaminação pode rapidamente tornar todo o lote da vacina virulento, comprometendo e limitando sua

utilização. Portanto, é necessário um teste de diagnóstico capaz de detectar animais persistentemente infectados e de diferenciar entre as espécies de *A. centrale* e *A. marginale* para auxiliar no controle da qualidade da vacina viva de *A. centrale* de forma a cumprir com as exigências do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

O controle da produção do antígeno deve estar sempre sendo avaliado para garantir uma amostra de *A. centrale* livre de contaminação com agentes patogênicos que possam causar reação com a sua inoculação, contribuindo à proteção contra anaplasose bovina sem a utilização indiscriminada de antibióticos (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) 2012).

1.13 Quimioterapia

A quimioterapia é mediada por antimicrobianos, principalmente por meio do grupo das tetraciclínas. A tetraciclina é utilizada no tratamento da anaplasose desde 1950, extensivamente nos Estados Unidos (KOCAN et al., 2000), de forma curativa e profilática. Porém, além de não ser um tratamento de dose única pode não ser totalmente eficaz (RICHEY and PALMER, 1992). Utilizar o sistema de antibioticoterapia como um modo de quimioesterilização não é eficiente mesmo com a utilização de doses elevadas de tetraciclina (COETZEE et al., 2006), os animais constituem-se como uma fonte portadora do microrganismo.

Atualmente no Brasil, a base da quimioterapia é realizada por meio de doses de 3 mg/kg de imidocarb (McHardy & Simpson 1974). Existem algumas restrições quanto ao uso deste medicamento. O descarte do leite produzido em período de carência do produto e a carne não deve ser destinada ao consumo humano até 28 dias após a medicação. Entretanto, as formulações do imidocarb são de fácil aplicação, uma vez que o volume da dose terapêutica é menor em relação às tetraciclínas e facilita as tarefas quando se deve aplicar tratamentos anaplasmasidas à vários bovinos para o controle de surtos de anaplasose (GUGLIELMONE A.A., MANGOLD A.J., MARTINS J.R., 2003).

A quimioprofilaxia pode ser realizada por meio da incorporação diária do antibiótico ao alimento do animal. Dificilmente este tipo de administração resulta em uma dosificação homogênea entre os animais e neste caso além de não ser eficaz pode favorecer ainda mais o surgimento de cepas resistentes (KOCAN et al., 2000).

2. OBJETIVO

Desenvolver uma PCR para diferenciar os isolados de *A. marginale* e *A. centrale*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material biológico

As amostras experimentalmente infectadas em bovinos oriundos de Santa Vitória do Palmar – RS, região teoricamente livre de carrapato, foram: a própria cepa vacinal de *A. centrale* (oriunda do Uruguai e originalmente importada de Israel), *A. marginale*, coinfecção de *A. centrale* e *A. marginale* e as cepas de *B. bovis* e *B. bigemina*, foram cedidas pelo Dr.º João Ricardo Martins, Médico Veterinário do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (FEPAGRO/IPVDF). As amostras de sangue de bovino livre de *Anaplasma* sp. foram coletadas de um bovino oriundo de Santa Vitória do Palmar- RS, mantido em estábulo, na Faculdade de Veterinária da UFRGS, em tubos à vácuo contendo aproximadamente 3,2% de citrato de sódio.

Todas as amostras foram fracionadas em tubos de 1,5 mL com 200 µL de sangue, criopreservadas com DMSO 10% e congeladas em nitrogênio líquido até extração do DNA genômico (DNAg).

3.2 Extração do DNAg

A extração do DNAg foi baseada no protocolo descrito por Bashiruddin (1999), com modificações segundo Sambrook and Russell (2001) e Alberts (2011), utilizando o método fenol:clorofórmio. A partir de 200 µL de amostra de sangue total, descongelado a 4°C e lavado três vezes com 1 mL de Tris-EDTA pH 7,4, centrifugado em centrífuga refrigerada (Himac - CR 21 F) a 4°C por 14.000 g por 2 minutos, para a digestão protéica foram adicionados 300 µL de água, 100 µL de sarcosil 10%, 100 µL de SDS 10% e 20 µL de proteinase K (5 mg/mL) (Promega), homogeneizado suavemente e incubado em banho-maria a 62°C por 1 hora. O DNAg foi isolado ao adicionar 400 µL de fenol tamponado pH 8,0 (USB) e 400 µL de clorofórmio. A solução foi centrifugada em centrífuga Mini spin (Eppendorf) a 14.000 g por 2 minutos a temperatura ambiente. Para precipitação do DNAg foi adicionado 500 µL de etanol 100% gelado e 50 µL de KCL (2M) gelado, seguido de incubação por 16 horas a - 20°C. As amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 4°C, em uma velocidade de 20.300 g por 30 minutos. O sedimento foi lavado com etanol 70% e secado a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora para posterior suspensão em 20 µL de água.

A qualidade e a concentração do DNAg extraído foram avaliados por espectrofotometria a 260 nm em aparelho ultrospec 10.000 (Pharmacia Biotech). O DNA também foi analisado em eletroforese em gel de agarose 0,8% (Promega) com Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1x) pH 8,0. A massa molecular do produto foi estimada por comparação com o marcador Hind III (Fermentas). O gel de agarose com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (Sigma), foi submetido à eletroforese a 100 V e o produto foi visualizado em transluminador ultravioleta e fotografado em câmera digital Nikon (modelo D70S). As amostras de DNAg de bovino não infectado foram processadas da mesma forma e serviram como controle negativo nas reações de PCR.

3.3 Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase

Os *primers* para amplificação dos genes *msp1a*, *msp3* e *msp4* foram projetados com modificações baseado no trabalho de Shkap et al. (2008), a partir das sequências

genômicas do isolado Israel de *A. marginale* e do isolado Israel de *A. centrale*, disponíveis no Genbank pelos números de acesso: AY786994 e M32871, AY054383 e AY586402 respectivamente, usando-se o programa vetor NTI® (Invitrogen).

Tabela 1. Projeto dos *primers* para detecção dos genes *msp1a*, *msp3* e *msp4*, número de acesso Genbank, posição e tamanho do amplicon, como determinado seguindo amplificação do DNA genômico do sangue de bovino infectado com *A. centrale* e sangue de bovino infectado com *A. marginale*.

Espécie (gene)	Primers	Posição	Amplicon (pb)	N. acesso
<i>A. centrale</i> (msp4)	For: catggggcatgaatgtg Rev: aattggtgcagtgagcgca	8-26 383-402	394	AY054383
<i>A. centrale</i> (msp3)	For: tccagaaggtgaaggagaaga Rev: gcatttacaggaaaggaagca	474-493 1444-1464	991	AY586402
<i>A. marginale</i> (msp4)	For: cccatgagtcacgaagtgg Rev: gctgaacaggaatcttgctcc	91-109 824-844	753	AY786994
<i>A. marginale</i> (msp1a)	For: tgcattacaacgaacgc Rev: gagatgcgctccaaggttg	1689-1706 2710-2728	1039	M32871

O protocolo inicial utilizado como modelo para a padronização da PCR convencional foi constituído por uma reação com volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão 10 x (10 mM de Tris-HCl pH 8,5, 500 mM KCl), 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,4 µL de uma mistura de dNTPs (10 mM de cada), 0,5 µL de cada primer (10 pmol/µL), 2,0 µL de DNA (10 ng/µL) e 0,25 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL Ludwig Biotec®). A reação foi realizada em termociclador PCR Mimicycler™ (MJ Research), programado para as seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguidos por um total de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. E uma extensão final a 72°C por 5 minutos e resfriamento a 4°C para cessar a amplificação. Para a revelação dos produtos de amplificação, retirou-se de cada tubo

10 µL de amostra e acrescentando 1 µL de tampão de amostra (Invitrogen), aplicou-se em gel de agarose 0,8% em TAE 1x contendo 0,5 mg/ µL de brometo de etídeo, que em seguida foi submetido à eletroforese a 100 V.

As variáveis estudadas durante a padronização da reação de PCR foram: temperatura de anelamento dos *primers*, concentração do cloreto de magnésio, quantidade de *primers*, quantidade de DNA molde de *Anaplasma* sp., análise da sensibilidade analítica da reação e análise da especificidade analítica dos *primers* de *A. centrale* e *A. marginale*.

3.3.1 Temperatura de anelamento dos *primers*

As temperaturas de anelamento testadas para as reações com as amostras de DNAg da vacina de *A. centrale*, de *A. marginale* e de DNAg de bovino livre de *Anaplasma* sp. foram: 49°C, 50°C, 51°C, 52°C e 53°C.

3.3.2 Concentração de cloreto de magnésio (MgCl₂)

Para obtenção da concentração ideal de MgCl₂ na reação de PCR foram testadas concentrações variáveis de MgCl₂. As quantidades variadas nas reações de PCR contendo DNAg de cada uma das espécies de *Anaplasma* ou contendo o DNAg de bovino livre de *Anaplasma* sp. foram: 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM e 3,0 mM.

3.3.3 Quantidade de *primers*

Para estabelecer a quantidade ideal de cada par de *primers* foram realizados testes com 2,5 pmol, 5,0 pmol e 10 pmol de cada par de *primers*.

3.3.4 Quantidade de DNA molde de *Anaplasma* sp.

A quantidade ideal de DNA molde de *Anaplasma* sp. foi determinada alterando a quantidade de DNAg de *A. centrale* e *A. marginale* assim como o DNAg de bovino livre de *Anaplasma* sp.. As quantidades foram de 20 ng, 15 ng, 10 ng, 5 ng e 1 ng em uma solução de 25 μ L.

3.3.5 Estimativa do limite de detecção da PCR

A partir da estimativa da concentração do DNAg por espectrofotometria foram realizadas sucessivas diluições da solução original contendo 1 ng/ μ L de DNAg: 1:10 (0,1 ng/ μ L), 1:100 (0,01 ng/ μ L), 1:1000 (0,001 ng/ μ L), 1:2000 (0,0005 ng/ μ L), 1:4000 (0,00025 ng/ μ L), 1:8000 (0,00125 ng/ μ L) e 1:10.000 (0,0001 ng/ μ L) e em seguida foi realizada a PCR convencional padronizada com 1 μ L das respectivas diluições para estimar a sensibilidade da PCR.

3.3.6 Especificidade analítica dos *primers*

A análise da especificidade analítica dos *primers* foi realizada a partir da PCR padronizada com os *primers* para o gene *msp4* de *A. centrale* e de *A. marginale* para amplificação do DNAg dos protozoários *B. bovis* e *B. bigemina* (10 ng/ μ L).

3.4. Sequenciamento do amplicon

Os amplicons obtidos pela técnica de PCR foram purificados utilizando o kit GeneClean® II (QBiogene MP Biomedicals LLC), conforme orientação do fabricante, e eletroforese conforme descrito no item 2.3.

Foi feita uma eletroforese em gel de agarose com o produto purificado para quantificação conforme o item 2.3. Preparações contendo 10 ng do DNA purificado de

A. centrale e *A. marginale*, e 3,2 pmol de cada *primer* para o gene *msp4* de *A. centrale* e *A. marginale*, foram analisadas no serviço de sequenciamento do laboratório de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no ABI Prism 3130xl Applied Biosystems.

3.5 Comparação entre PCR e Microscopia

Foram analisadas por PCR 13 amostras de bezerros dos municípios de São Gabriel, Guaíba e Alegrete e comparadas com os testes de microscopia óptica previamente realizados no laboratório do IPVDF.

4. RESULTADOS

4.1 Temperatura de anelamento dos *primers*

O resultado da PCR convencional utilizando os pares de *primers* para o gene *msp4* e os respectivos DNAs das amostras de sangue de bovinos infectados experimentalmente com *A. centrale* ou com *A. marginale*, apresentaram os fragmentos específicos de 394 pares de bases (pb) para *A. centrale* e 753 pares de bases (pb) para *A. marginale*. Os demais *primers* testados foram descartados, pois não apresentaram os resultados esperados. Os pares de *primers* para o gene *msp1 α* de *A. marginale* não foram utilizados devido à diferença de tamanho do amplicon obtido frente ao esperado, já os pares de *primers* para o gene *msp3* de *A. centrale* não foram utilizados devido ao grande número de bandas inespecíficas visualizadas no gel de agarose.

Bandas mais nítidas foram visualizadas através do gel de agarose 0,8%, na temperatura de 53°C, correspondentes tanto ao fragmento de *A. centrale* (figura 4) quanto ao fragmento de *A. marginale* (figura 5). Temperaturas de anelamento abaixo

esta resultaram em anelamento não específico, e, portanto sem amplificação inespecífica.



Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente à PCR de padronização da temperatura de anelamento dos *primers* para o gene *msp4* de *A. centrale*. As variações de temperatura a 49°C, 50°C, 51°C, 52°C e 53°C correspondem às canaletas de 1 – 5 contendo DNAg de *A. centrale* e as canaletas de 6 - 10 contendo DNAg de bovino livre de *Anaplasma* sp. respectivamente. O PCR foi realizado utilizando 20 ng de DNAg alvo, 5,0 pmol de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂, 0,16 mM de dNTP, tampão da reação e 1,25 U Taq DNA polimerase.

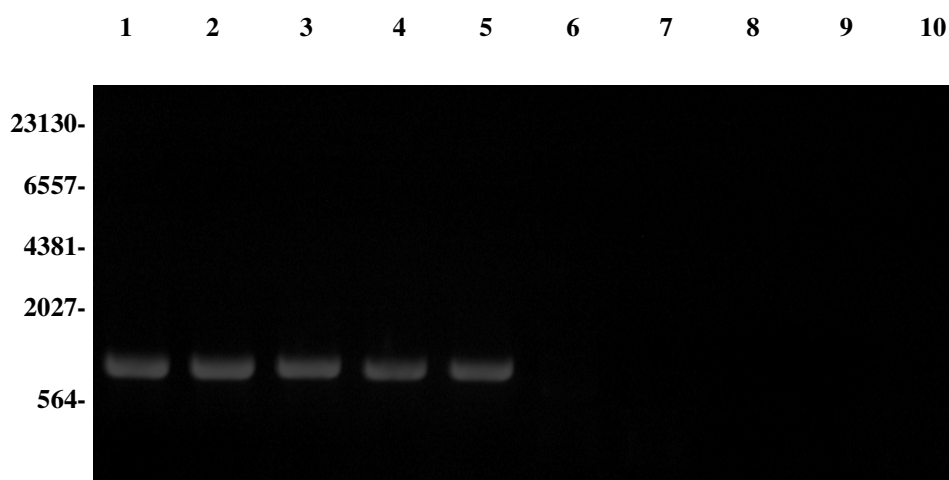


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente à PCR de padronização da temperatura de anelamento dos *primers* para o gene *msp4* de *A. marginale*. As variações de temperatura a 49°C, 50°C, 51°C, 52°C e 53°C

correspondem as canaletas de 1 - 5 contendo DNAg de *A. marginale*, 6 – 10 contendo DNAg de bovino livre de *Anaplasma* sp. O PCR foi realizado utilizando 20 ng de DNAg alvo, 5,0 pmol de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂, 0,16 mM de dNTP, tampão da reação e 1,25 U Taq DNA polimerase.

4.2 Concentração de cloreto de magnésio (MgCl₂)

Nas menores concentrações de MgCl₂ houve pouco produto amplificado, e em altas concentrações de MgCl₂ houve a formação de bandas inespecíficas, assim como pode-se visualizar na figura 6. Dessa forma, a concentração ideal do cloreto de magnésio estabelecida foi de 1,5 mM, a qual se mostrou com maior rendimento como visualizado na figura 7.

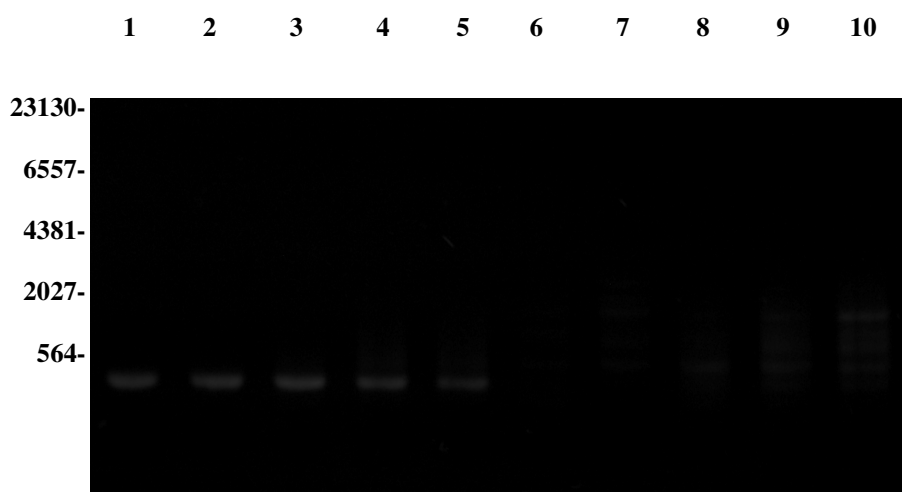


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente à PCR de padronização da concentração do cloreto de magnésio para as amostras de DNAg de *A. centrale*, com seu respectivo *primer* para o gene *msp4*. Amostras de 1 - 5 contendo DNAg de *A. centrale* com 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM e 3,0 mM de cloreto de magnésio respectivamente e amostras de 6 – 10 contendo DNAg de bovino livre de *Anaplasma* sp. com 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM e 3,0 mM de cloreto de magnésio respectivamente. O PCR foi realizado utilizando 20 ng de DNAg, 5,0 pmol de cada *primer*, 0,16 mM de dNTP, tampão da reação, 1,25 U Taq DNA polimerase e a 53°C.

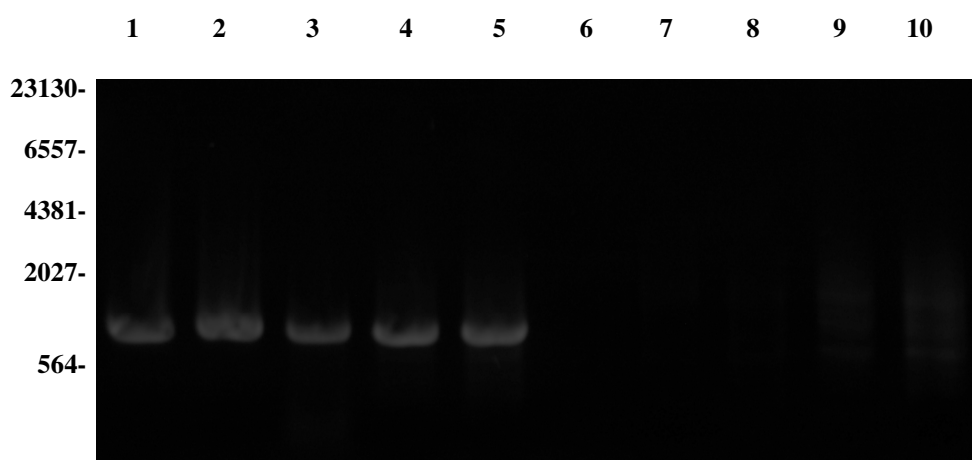


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente à PCR de padronização da concentração do cloreto de magnésio para as amostras de DNAg de *A. marginale*, com o par de *primer* para seu respectivo gene *msp4*. Amostras de 1 - 5 contendo DNAg de *A. marginale* com 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM e 3,0 mM de cloreto de magnésio respectivamente, e as amostras de 6 – 10 contendo DNAg de bovino livre de *Anaplasma* sp. com 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM e 3,0 mM de cloreto de magnésio respectivamente. O PCR foi realizado utilizando 20 ng de DNAg alvo, 5,0 pmol de cada *primer*, 0,16 mM de dNTP, tampão da reação, 1,25 U Taq DNA polimerase e a 53°C.

4.3 Quantidade de *primers*

A quantidade ideal de *primers* para as reações de PCR foi de 5 pmol, a qual apresentou uma banda mais forte do produto amplificado assim como pode ser observado na figura 8.

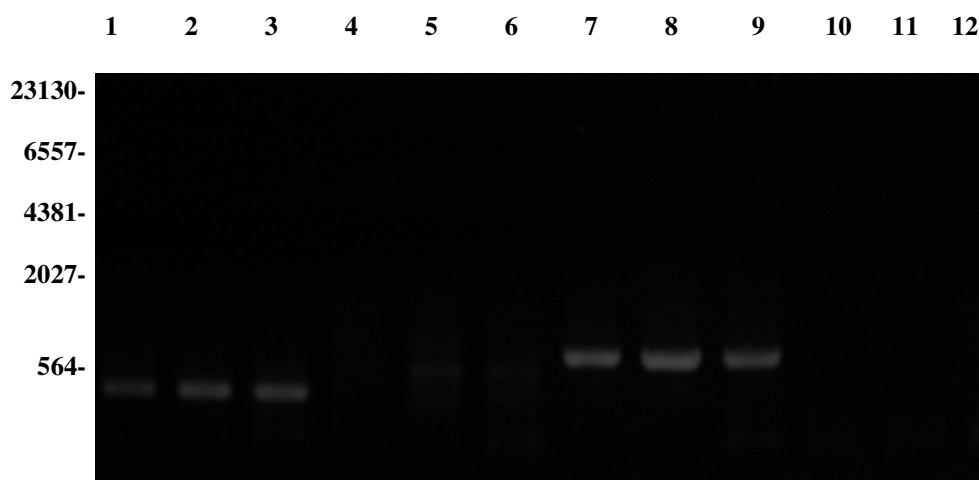


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente à PCR de padronização da quantidade de *primers* para as amostras de DNAg de *A. centrale* e *A. marginale*, com os respectivos *primers* para o gene *msp4*. Amostras de 1 – 3 contendo DNAg de *A. centrale* com 2,5 pmol, 5,0 pmol e 10 pmol de *primers* respectivamente, as amostras de 7 - 9 contendo DNAg de *A. marginale* com 2,5 pmol, 5,0 pmol, e 10 pmol de *primers* respectivamente, e as amostras de 4 – 6 e 10 - 12 contendo DNAg de bovino livre de *Anaplasma* sp. com 2,5 pmol, 5,0 pmol e 10 pmol de *primers* respectivamente. O PCR foi realizado utilizando 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,16 mM de dNTP, 20 ng de DNAg, tampão da enzima, 1,25 U Taq DNA polimerase e a 53°C.

4.4 Quantidade de DNA molde de *Anaplasma* sp.

A quantidade ideal de DNA molde de *Anaplasma* sp. na reação de PCR foi de 1 ng, apresentando uma amplificação dos produtos esperados, sem nenhuma banda aparente na canaleta contendo o DNAg de bovino livre de *Anaplasma* sp.

4.5 Reação da PCR convencional padronizada

O protocolo final da reação de PCR convencional incluiu um par de *primers* da região conservada da proteína de superfície principal quatro (MSP4) de *A. centrale* e

um par de *primers* da MSP4 de *A. marginale* projetados com modificações baseado no trabalho de Shkap et al. (2008), utilizando sequencias depositadas no GenBank (AY054383 e AY786994).

Os testes de amplificação dos genes foram realizados por meio de PCR em reações preparadas com um volume final de 25 μ L, contendo 2,5 μ L de tampão 10 x (10 mM de Tris-HCl pH 8,5 (500 mM KCl), 0,75 μ L de $MgCl_2$ (50 mM), 0,4 μ L de uma mistura de dNTPs (10 mM de cada), 0,5 μ L de cada *primer* (10 pmol/ μ L), 1,0 μ L de DNA (1 ng/ μ L) e 0,25 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L Ludwig Biotec ®). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PCR Mimicycler™ (MJ Research), programado para ter um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguidos por um total de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 53°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. E uma extensão final a 72°C por 5 minutos e resfriamento a 4°C para cessar a amplificação.

4.6 Estimativa do limite de detecção da PCR

A partir da estimativa da concentração de DNAG por espectrofometria foram realizadas sucessivas diluições da solução original, contendo 1 ng/uL de DNAG: 1:10 (0,1 ng/ uL), 1:100 (0,01 ng/ uL), 1: 1000 (0,001 ng/ uL), 1: 2000 (0,0005 ng/ uL), 1:4000 (0,00025 ng/ uL), 1:8000 (0,000125 ng/ uL) e 1:10.000 (0,0001 ng/ uL). Em seguida foi realizada a PCR convencional padronizada com 1 uL das respectivas diluições.

Como mostram as figuras 9 e 10, as reações foram positivas em todas as diluições exceto nas canaletas 6 e 7, as quais são correspondentes a 0,00025 ng/ uL e 0,000125 ng/ uL para o DNAG de *A. centrale* e para o DNAG de *A. marginale* respectivamente. Dessa forma o limite da detecção da PCR convencional foi estimada em 0,25 pg para o DNAG de *A. centrale* e de 0,125 pg para o DNAG de *A. marginale*.

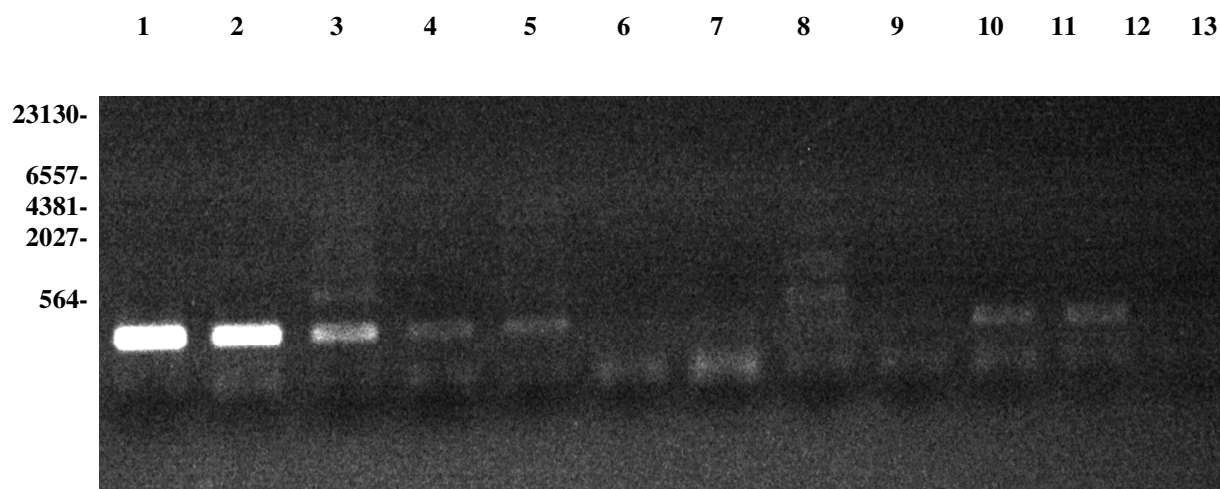


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente ao teste de sensibilidade da PCR padronizada com os *primers* para o gene *msp4* de *A. centrale*. Amostras de 1 – 7 contendo DNAG de *A. centrale* nas concentrações de 0,1 ng, 0,01 ng, 0,001 ng, 0,0005 ng, 0,00025 ng, 0,000125 ng, 0,0001 ng e as amostras de 8 – 14 contendo DNAG de bovino livre de *Anaplasma* sp. nas mesmas concentrações. O PCR foi realizado utilizando 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,16 mM de dNTP, 5,0 pmol de cada *primers*, 1,25 U Taq DNA polimerase, tampão da enzima e a 53°C.

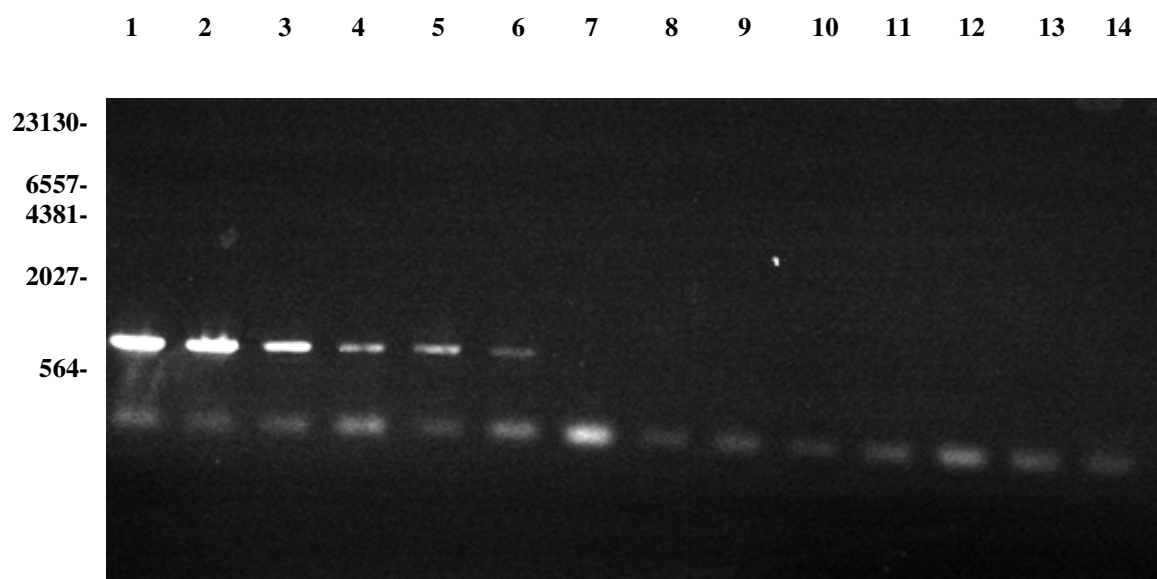


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente ao teste de sensibilidade da PCR padronizada com os *primers* para o gene *msp4* de *A. marginale*. Amostras de 1 – 7 contendo DNAG de *A. marginale* nas

concentrações de 0,1 ng, 0,01 ng, 0,001 ng, 0,0005 ng, 0,00025 ng, 0,000125 ng, 0,0001 ng e as amostras de 8 – 14 contendo DNAG de bovino livre de *Anaplasma* sp. nas concentrações de 0,1 ng, 0,01 ng, 0,001 ng, 0,0005 ng, 0,00025 ng, 0,000125 ng, 0,0001 ng. O PCR foi realizado utilizando 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,16 mM de dNTP, 5,0 pmol de cada *primer*, 1,25 U Taq DNA polimerase, tampão da enzima e a 53°C.

4.7 Especificidade analítica dos *primers*

A técnica de PCR utilizando os pares de *primers* para *A. centrale* e para *A. marginale* revelou ser específica, não amplificando o DNAG dos hematozoários *B. bovis* e *B. bigemina*. Esses *primers* foram capazes de amplificar os fragmentos esperados e de diferenciar as duas espécies de *Anaplasma*.



Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, referente à análise da especificidade dos *primers* para o gene *msp4* de *A. centrale* e para o gene *msp4* de *A. marginale* da PCR padronizada. As amostras 1, 3, 5 e 8 com os *primers* para o gene *msp4* para *A. centrale* e as amostras 2, 4, 7 e 9 com os *primers* para o gene *msp4* para *A. marginale*. Amostra 1. com DNAG de *A. centrale*, 2. com DNAG de *A. marginale*, 3. e 4. com DNAG de *B. bovis*, 5. e 6. com DNAG de *B. bigemina* e as amostras 7. e 8. com DNAG de bovino livre de *Anaplasma* sp.. O PCR foi realizado

utilizando 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,16 mM de dNTP, 5,0 pmol de cada *primer*, 1 ng de DNAg, 1,25 U Taq DNA polimerase, tampão da enzima e a 53°C.

4.8 Sequenciamento dos amplicons

O sequenciamento do produto amplificado confirmou a identidade da sequência amplificada e especificidade dos *primers*. Os dois amplicons apresentaram 100% de identidade com as sequências de nucleotídeos depositados no Genbank pelo número de acesso: JN564652 para o gene *msp4* de *A. marginale* e CP001759 para o gene *msp4* de *A. centrale*.

4.9 Comparação entre PCR e microscopia

Comparando os resultados do teste de PCR convencional com os testes microscópicos previamente realizados pelo laboratório do IPVDF, a PCR mostrou-se de maior sensibilidade analítica e especificidade. Dentre as 13 amostras de bovinos de campo analisadas, apenas quatro delas concordaram com os resultados do esfregaço sanguíneo. O restante das amostras foi positivo para *A. marginale*, e duas dessas amostras analisadas foram positivas para infecções concomitantes de *A. marginale* e *A. centrale* apenas quando analisadas por PCR. Como o PCR é uma técnica mais sensível, pode detectar *A. marginale* em bovinos persistentemente infectados, além de diagnosticar a cepa vacinal em bezerros, ao contrário do teste microscópico o qual detectou apenas *A. marginale* em bovinos sintomáticos.

Tabela 2. Comparação dos resultados de microscopia e PCR das amostras de bovinos dos municípios de Guaíba, São Gabriel e Alegrete naturalmente infectados com *Anaplasma* sp.

Amostras	Microscopia		PCR
	<i>A. marginale</i>	<i>A. centrale</i>	<i>A. marginale</i>
1.	Positivo	Negativo	Positivo
2.	Positivo	Positivo	Positivo
3.	Positivo	Negativo	Positivo
4.	Positivo	Negativo	Positivo
5.	Negativo	Negativo	Positivo
6.	Negativo	Negativo	Positivo
7.	Negativo	Negativo	Positivo
8.	Negativo	Negativo	Positivo
9.	Negativo	Negativo	Positivo
10.	Negativo	Negativo	Positivo
11.	Negativo	Negativo	Positivo
12.	Negativo	Positivo	Positivo
13.	Negativo	Negativo	Positivo

5. DISCUSSÃO

Para alcançar os objetivos propostos no presente estudo foi realizada digestão enzimática das proteínas das amostras infectadas e não infectadas com os patógenos por lise enzimática com proteinase K seguida de extração por fenol:clorofórmio. A extração apresentou bons resultados quanto ao custo e benefício, por ser uma extração barata, rápida e prática, de boa qualidade e rendimento. A PCR convencional também é uma técnica rápida, sensível e não necessita da viabilidade dos patógenos para a realização do teste, permitindo que as amostras sejam armazenadas antes da detecção do agente patogênico (GILLESPIE, 1990).

O PCR convencional foi padronizado através da padronização da temperatura de anelamento dos *primers*, concentração ideal de cloreto de magnésio, quantidade de *primers* e de DNAg. A temperatura ideal é talvez o fator mais crítico para a obtenção de uma alta especificidade dos *primers*. Quando a temperatura é muito alta, pouco ou nenhum anelamento podem ocorrer, mas se muito baixa, aumenta o número de anelamentos inespecíficos. Teoricamente a temperatura ideal de anelamento dos *primers* deve ser 5°C abaixo da menor temperatura de *melting* (TM) do par de *primers*, a qual depende do seu comprimento e da sua composição (ROSSETTI, SILVA e RODRIGUES, 2006). Entretanto, na prática o estabelecimento da temperatura ótima de anelamento de um *primer* às vezes é variável, pois temperaturas de anelamento (Ta) dos *primers* para o gene *msp4* de *A. marginale* seria em torno de 55°C, já para o gene *msp4* de *A. centrale* em 53°C, a qual foi a Ta ideal para detecção dos dois microrganismos, apresentando alta especificidade dos mesmos. Os íons de magnésio atuam principalmente como cofator para a enzima Taq DNA polimerase, mas também podem afetar na temperatura de desnaturação das fitas de DNA e assim no anelamento dos *primers*. A concentração ideal deste reagente na reação de PCR varia de 1,3 a 5,0 mM, sendo possível regular a especificidade dos *primers* modificando apenas a concentração deste reagente ao invés de aumentar a temperatura de anelamento. Porém, na reação os dNTPs podem interferir na concentração ideal do cloreto de magnésio, reduzindo seus íons livres (BAUMFORTH et al., 1999). Logo, a concentração de íons de magnésio a qual foi de 1,5 mM total, livres na solução pode estar em uma concentração de 1,3 mM. Contudo, concentrações maiores que 1,5 mM total na solução são responsáveis pelo aparecimento de produtos inespecíficos devido à alta atividade da enzima (HENEGARIU et al., 1997). O efeito da concentração dos íons de magnésio varia com diferentes pares de *primers* e diferentes concentrações de DNA molde, de maneira que a concentração ótima deve ser determinada para cada situação (ROSSETTI, SILVA e RODRIGUES, 2006).

A quantidade ideal dos *primers* recomendada é entre 0,1 e 0,5 µM para cada 0,2 µg de DNA molde de *Anaplasma* sp. (INNIS e GELFAND, 1990). A complementaridade total entre os *primers* e DNA alvo não é necessária para que a síntese ocorra, porém os *primers* devem ser o mais específico possível para a sequência alvo (ROSSETTI, SILVA e RODRIGUES, 2006). As quantidade ideais de cada *primer* utilizado para

amplificação do gene *msp4* de *A. centrale* e de *A. marginale* foram ideais à 5 pmol. A quantidade determinada dos *primers* foi eficiente para um bom rendimento da PCR assim como impediu o surgimento de produtos inespecíficos tais como dímeros de *primers*. A extensão dos *primers* foi conduzida a 72°C, temperatura ótima para a ação da Taq DNA Polimerase, a qual amplifica em um minuto mil bases (CURY, FURUSE e ARAÚJO, 2005).

Uma baixa quantidade de DNA molde é necessária para uma melhor especificidade do PCR (CURY, FURUSE e ARAÚJO, 2005), 1 ng de DNA molde de *Anaplasma* sp. foi a quantidade que se mostrou ideal tanto para o anelamento dos *primers* quanto para a não formação de produtos inespecíficos.

O gene *msp4* é conservado entre as espécies de *Anaplasma* (KANO et al., 2002; OBERLE et al., 1993), porém não é idêntico entre as espécies. Por isso, foi possível a construção de *primers* específicos, os quais independentemente de as cepas serem patogênicas ou não patogênicas, detectou e diferenciou as espécies de *A. centrale* e *A. marginale* com especificidade, não amplificando o DNAg de outros hemoparasitos como *B. bovis* e *B. bigemina*, os quais são motivos de insucesso na detecção de bovinos verdadeiramente negativos nos testes de ELISA, por apresentar grande reatividade cruzada nos testes de anaplasmoze bovina (AUBRY and GEALE, 2011).

Todas as amostras de bezerras a campo analisadas por PCR apresentaram-se positivas para *A. marginale*. Dessa forma, podemos concluir que os municípios de São Gabriel, Guaíba e Alegrete indicam uma situação endêmica.

A padronização da PCR foi capaz de discriminar entre as duas espécies de *Anaplasma* com uma sensibilidade de 0,25 pg para o DNAg de *A. centrale* e de 0,125 pg para o DNAg de *A. marginale*, compatível com a sensibilidade da PCR convencional descrita por Ge et al. (1995). Por meio da PCR foi possível identificar e diferenciar as espécies de *Anaplasma* sp. em bovinos infectados e persistentemente infectados em amostras de campo, mostrando-se também boa sensibilidade quando comparado ao teste microscópico, visto que a maior dificuldade na detecção da infecção por *A. marginale* com os testes de esfregaço é quando esta se apresenta em caráter assintomático (KOCAN et al., 1992a). Sendo assim, bovinos negativos para a infecção por *A.*

marginale através do método de esfregaço sanguíneo, não são bovinos indicados para a produção da vacina de *A. centrale*, visto que podem apresentar quantidades mínimas que são indetectáveis microscopicamente. Ainda que, animais tratados com tetraciclina, há a diminuição do nível de parasitemia e conseqüentemente dos níveis de anticorpos contra *Anaplasma* sp., acarretando em animais sorologicamente negativos para *A. marginale* (KOCAN et al., 2000). Através do método da PCR foi possível detectar tanto bovinos infectados persistentemente com *A. marginale* quanto bovinos vacinados com *A. centrale*.

Embora a cepa de *A. centrale* seja menos patogênica que *A. marginale*, pode causar, eventualmente, doença clínica em bovinos adultos e falha na proteção contra cepas muito virulentas de *A. marginale* (SACCO, 2001). A ocorrência de falhas da vacina contra *A. marginale* em bovinos vacinados é insignificante (CALLOW, 1979) e incomum. Investigações mostraram que as principais causas da falha da vacina se devem mais a falta de viabilidade do que ausência de imunogenicidade (BOCK and DEVOS, 2001). A variabilidade da proteção parece estar envolvida com o rebanho, ou com a viabilidade de cada bovino em montar uma resposta imune protetora, a qual é influenciada por inúmeros fatores tais como raça, idade (WILSON, 1979), ingestão de colostro, estresse nutricional ou ambiental (KUTTLER, 1984; WILSON, 1979) e infecções concomitantes (BOCK et al., 1999; WILSON, 1979).

Mesmo que os bovinos esplenectomizados, oriundos de regiões livres de carrapatos, sirva de sentinela quanto uma contaminação acidental por *A. marginale* através de insetos hematófagos (KESSLER, 2001), já que os estábulos onde estes bovinos são mantidos, seguem rigorosamente os critérios de eliminação dos riscos de contaminação da vacina. É necessário a adoção de um controle rígido de qualidade que permita maior segurança e tranquilidade com sua utilização (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) 2012).

Sem a necessidade de acompanhamento intensivo, a vacina viva de *A. centrale* é um dos métodos de imunização mais econômico e seguro dentre os outros métodos de imunização utilizados atualmente em todo o mundo (KESSLER et al., 2002). E a PCR é uma ferramenta molecular útil para auxiliar no controle de qualidade durante e após a produção da vacina de *A. centrale*, tranquilizando quanto a sua comercialização de

forma que toda a pecuária possa contar com uma vacina segura, econômica e eficiente para proteger seu rebanho contra a anaplasmoze bovina.

6. CONCLUSÃO

1. A PCR para detecção e diferenciação das espécies de *A. centrale* e *A. marginale* foi padronizada nas condições de: 1,5 mM de cloreto de magnésio, 5 pmol de *primers*, 1 ng de DNAg de *Anaplasma* sp. e à temperatura de 53°C como temperatura ideal de anelamento dos *primers*.

2. A PCR analisou quanto a contaminação por *A. marginale* em uma amostra vacinal a qual foi produzida pelo IPVDF/FEPAGRO e se mostrou livre de contaminação por este patógeno.

3. A PCR detectou e diferenciou as espécies de *A. marginale* e *A. centrale* em amostras de campo, servindo para detectar bovinos persistentemente infectados com *A. marginale* e vacinados com *A. centrale*.

7. PERSPECTIVAS

Utilizar a PCR padronizada como um método molecular útil para:

1. Verificar possível contaminação por *A. marginale* na vacina de *A. centrale* produzida no Estado do Rio Grande do Sul.
2. Auxiliar no controle de qualidade da vacina contra anaplasmoze.

8. REFERÊNCIAS

ABDALA, A. A. et al. Frozen and fresh *Anaplasma centrale* vaccines in the protection of cattle against *Anaplasma marginale* infection. **Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux**, v. 43, n. 2, p. 155-158, 1990.

AGNES, J. T. et al. Identification of *Anaplasma marginale* outer membrane protein antigens conserved between *A. marginale* sensu stricto strains and the live *A. marginale* subsp. *centrale* vaccine. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1311-1318, 2011.

AGUIRRE, D. H. et al. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult Boophilus microplus ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. **Parasite**, v. 1, n. 4, p. 405-407, 1994.

AGUIRRE, D. H. et al. Natural infection with *Anaplasma marginale* in cattle of the Hereford, Criolla, and Nelore breeds in Tucuman, Argentina. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 30, n. 1, p. 37-41, 1988.

ALBERTS, B. Fundamentos da biologia celular 3rd. ed. Imprensa Porto Alegre, RS: Artmed, 2011. 843 p.

ALLEMAN, A. R. et al. *Anaplasma marginale* major surface protein 3 is encoded by a polymorphic, multigene family. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 1, p. 156-163, 1997.

ALLRED, D. R. et al. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 8, p. 3220-3224, 1990.

ARAÚJO, F. R. et al. Progressos na imunização contra *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 4, n. 23, p. 139-148, 2003.

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

BARBET, A. F. et al. Antigenic variation of *Anaplasma marginale* by expression of MSP2 mosaics. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, p. 6133-6138, 2000.

BARBET, A. F. et al. Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 102-107, 1999.

BARBET, A. F. et al. 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.

BARROS, S. L. et al. 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.

BASHIRUDDIN, J. B.; CAMMA, C.; REBELO, E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. **Veterinary Parasitology**, v. 84, n. 1-2, p. 75-83, 1999.

BAUMFORTH, K. R. et al. The polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Pathology**, v.52, n.1, p. 1-10, 1999.

BENAVIDES, E. et al. Attenuated trivalent vaccine against babesiosis and anaplasmosis in Colombia. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 916, p. 613-616, 2000.

BOCK, R. E. et al. Assessment of a low virulence Australian isolate of *Anaplasma marginale* for pathogenicity, immunogenicity and transmissibility by *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 118, n. 1-2, p. 121-131, 2003.

BOCK, R. E.; DE VOS, A. J. Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 12, p. 832-839, 2001.

BOCK, R. E.; KINGSTON, T. G.; DE VOS, A. J. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Anaplasma marginale* transmitted by *Boophilus microplus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 11, p. 748-751, 1999.

BOSE, R. et al. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 61-74, 1995.

BOWIE, M. V. et al. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. **Gene**, v. 282, n. 1-2, p. 95-102, 2002.

BRAYTON, K. A. et al. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 3, p. 844-849, 2005.

BRAYTON, K. A. et al. 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.

BRITO, L. G. et al. Extração de DNA a partir de coágulos sanguíneos bovinos. Porto Velho: **Embrapa Rondônia**, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n. 43, 2006. p.13. Disponível em: <
http://www.cpafrro.embrapa.br/media/arquivos/publicacoes/bpd43_dnabovinos_.pdf>. Acesso em 16 Set. 2012.

BRIZUELA, C. M. et al. The safety and efficacy of Australian tick-borne disease vaccine strains in cattle in Paraguay. **Veterinary Parasitology**, v. 76, n. 1-2, p. 27-41, 1998.

BROCK, W. E. Anaplasmosis vaccines and their relation to anaplasmosis control. **J. American Veterinary Medical Association**, v. 147, n. 12, p. 1563-1564, 1965.

BROWN, W. C. Adaptive immunity to *Anaplasma* pathogens and immune dysregulation: implications for bacterial persistence. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 241-252, 2012.

BROWN, W. C. et al. 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. et al. CD4(+) T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 11, p. 5406-5413, 1998.

CALLOW, L. L. Some aspects of the epidemiology and control of bovine babesiosis in Australia. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 50, n. 4, p. 353-356, 1979.

CARELLI, G. et al. First report of bovine anaplasmosis caused by *Anaplasma centrale* in Europe. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 1149, p. 107-110, 2008.

COETZEE, J. F. and APLEY, M. D. Efficacy of enrofloxacin against severe experimental *Anaplasma marginale* infections in splenectomized calves. **Veterinary Therapeutics**, v. 7, n. 3, p. 319-328, 2006.

COETZEE, J. F.; APLEY, M. D.; KOCAN, K. M. Comparison of the efficacy of enrofloxacin, imidocarb, and oxytetracycline for clearance of persistent *Anaplasma marginale* infections in cattle. **Veterinary Therapeutics**, v. 7, n. 4, p. 347-360, 2006.

CURY, P. R.; FURUSE C.; ARAÚJO, N. S. Técnica e Aplicação da Reação da Polimerase em Cadeia na Área Odontológica. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 26, n. 2, p. 34-39, 2005.

COWAN, J. A. The Biological chemistry of magnesium; VCH publishers, Inc.: New York, 1995.

DARLINGTON, P. B. Anaplasmosis in cattle (Galziete) found to exist in Kansas. **North American Veterinary**, v. 7, p. 39-41, 1926.

DARK, M. J. et al. Comparative genomics of *Anaplasma marginale*. In: 20th Meeting of the American Society for Rickettsiology in conjunction with the 5th International Conference on Bartonella as Emerging Pathogens. American Society for Rickettsiology, Pacific Grove- CA, 2006. p. 105.

DE LA FUENTE, F. J. et al. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 3-4, p. 307-316, 2004.

DE LA FUENTE, J. et al. 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, 2003.

DE LA FUENTE, J. et al. Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular ehrlichia *Anaplasma marginale* excludes infection with other genotypes. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 3, p. 658-668, 2002.

DE LA FUENTE, F. J. et al. Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Animal Health Research Reviews**, v. 2, n. 2, p. 163-173, 2001.

DE LA FUENTE, J. et al. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen *Anaplasma marginale* to bovine erythrocytes and tick cells. **Internation Journal for Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 145-153, 2001a.

DE LA FUENTE, J. et al. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of *Anaplasma marginale*. **Internation Journal for Parasitology**, v. 31, n. 14, p. 1705-1714, 2001b.

DE LA FUENTE, J.; KOCAN, K. M. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants in persistently infected ticks. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 5151-5156, 2001c.

DREHER, U. M. et al. Seroprevalence of anaplasmosis among cattle in Switzerland in 1998 and 2003: no evidence of an emerging disease. **Veterinary Microbiology**, v. 107, n. 1-2, p. 71-79, 2005.

DUMLER, J. S. et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

ERIKS, I. S.; STILLER, D.; PALMER, G. H. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2091-2096, 1993.

ERIKS, I. S. et al. Detection and quantitation of *Anaplasma marginale* in carrier cattle by using a nucleic acid probe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 279-284, 1989.

ESTES, D. M.; CLOSSER, N. M.; ALLEN, G. K. IFN-gamma stimulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti-mu and mitogen. **Cellular Immunology**, v. 154, n. 1, p. 287-295, 1994.

ESTRADA-PENA, A.; AYLLON, N.; DE LA FUENTE, J. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. **Frontiers Physiology**, v. 3, p. 64, 2012.

FARIAS, N. A. Tristeza parasitária bovina. In: Riet-Correa F.; Schild A. L.; Lemos R. A. A.; Méndez M. C. Doenças de Ruminantes e Equinos. Varela: São Paulo, 2001. p. 35-42.

FARIAS, N. A. da R. Diagnóstico e controle da tristeza parasitária bovina. Guaíba, Porto Alegre: Agropecuária, 1995, 80p.

FRENCH, D. M. et al. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 3, p. 1200-1207, 1998.

FIGUEROA, J.V. et al. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v.50, p.69-81, 1993.

GARCIA-GARCIA, J. C. et al. 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. et al. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales:Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari:Ixodidae) infected as adults by using nonradioactive in situ hybridization and microscopy. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 911-920, 1996.

GE, N. L. et al. Detection of *Anaplasma marginale* DNA in bovine erythrocytes by slot-blot and in situ hybridization with a PCR-mediated digoxigenin-labeled DNA probe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, n. 4, p. 465-472, 1995.

GILLESPIE, D. The magic and challenge of DNA probes as diagnostic reagents. **Veterinary Microbiology**, v. 24, n. 3-4, p. 217-233, 1990.

GITHEKO, A. K. et al. Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. **Bull World Health Organ**, v. 78, n. 9, p. 1136-1147, 2000.

GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 187-194, 2000.

GUEDES, D. S., JR. et al. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the

Northeastern region of the State of Para, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 105-109, 2008.

GUGLIELMONE A.A., MANGOLD A.J., MARTINS J.R. Fármacos utilizados contra a anaplasmosse bovina- revisão bibliográfica. **A Hora Veterinária**. n.133, p. 35-39, 2003.

HAWKINS, J.A., LOVE, J.N., HIDALGO, R.J. Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: Tabanidae). **American Journal Veterinary Research**, v. 43, p. 732-734, 1982.

HENEGARIU, O. et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**, v. 23, n. 3, p. 504-511, 1997.

HERNDON, D. R. et al. Complete genome sequence of *Anaplasma marginale* subsp. *centrale*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 1, p. 379-380, 2010.

HOFMANN-LEHMANN, R. et al. Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3775-3780, 2004.

HOPE, M. et al. A novel antigen from *Anaplasma marginale*: characterization, expression and preliminary evaluation of the recombinant protein. **Vaccine**, v. 22, n. 3-4, p. 407-415, 2004.

HOWDEN, K. J. et al. An update on bovine anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) in Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, n. 8, p. 837-840, 2010.

HOWELL, D. E.; STILES, G. W.; MOE, L. H. The flow tick (*Argas Persicus*), a new vector of anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 4, pp. 73-75, 1941.

INNIS, M. A. and GELFAND, D. H. Optimisation of PCRs. In: Innis MA: PCR protocols a guide to methods and application. Academic Press: New York, 1990. p. 3-12.

JONSSON, N. N.; BOCK, R. E.; JORGENSEN, W. K. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1-2, p. 1-9, 2008.

JONSSON, N. N.; DAVIS, R.; DE, W. M. An estimate of the economic effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on Queensland dairy farms. **Australian Veterinary Journal**, v. 79, n. 12, p. 826-831, 2001.

KANO, F. S. et al. Antigenic characterization of *Anaplasma marginale* isolates from different regions of Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 2, p. 131-138, 2002.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.

KESSLER, R. H., et al. Tristeza Parasitária dos Bovinos: Quando Vacinar é Preciso. **Embrapa Gado de Corte**. 2002.

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

KOCAN, K. M. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 95-107, 2010.

KOCAN, K. M. et al. Silencing of genes involved in *Anaplasma marginale*-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in *Dermacentor variabilis*. **BMC. Developmental Biology**, v. 9, p. 42, 2009.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F. Characterization of the tick-pathogen-host interface of the tick-borne rickettsia *Anaplasma marginale*. In: Tick. Biology, Disease and Control, 2008. 325p.

KOCAN, K. M. et al. Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 5, p. 864-874, 2005.

KOCAN, K. M. et al. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v. 129 Suppl, p. S285-S300, 2004.

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

KOCAN, K. M. et al. Adaptations of the tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, for survival in cattle and ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, n. 1-4, p. 9-25, 2002.

KOCAN, K. M. et al. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 1-2, p. 151-161, 2001.

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

KOCAN, K. M. Recent advances in the biology of *Anaplasma* spp. in *Dermacentor andersoni* ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 653, p. 26-32, 1992.

KOCAN, K. M. et al. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible calves. **Journal of Medical Entomology**, v. 29, n. 4, p. 657-668, 1992a.

KOCAN, K. M. et al. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. **American Journal Veterinary Research**, v. 53, n. 4, p. 499-507, 1992b.

KOCAN, K. M. et al. Demonstration of *Anaplasma marginale* Theiler in *Dermacentor variabilis* (Say) by ferritin-conjugated antibody technique. **American Journal Veterinary Research**, v. 41, n. 12, p. 1977-1981, 1980.

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

KUTTLER, K. L. The effect of Imidocarb treatment on *Babesia* in the bovine and the tick (*Boophilus microplus*). **Research in Veterinary Science**, v. 18, n. 2, p. 198-200, 1975.

KWAK, Y. R. and SMITH, R. D. Evaluation of the diagnostic performance of *Anaplasma marginale* antigens identified by Western Blotting. Proc of Eight Nat Vet Hemop Disease, Conf. St. Louis, MO, 1989. p. 281-288.

LASMAR, P. V. et al. Evaluating the effectiveness of an inactivated vaccine from *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 112-117, 2012.

LEAL, M. et al. Identification and characterization of corpuscular, soluble and secreted antigens of a Venezuelan isolate of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 1-2, p. 1-15, 2000.

LOHR, C. V. et al. Specific expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 salivary gland variants occurs in the midgut and is an early event during tick transmission. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 114-120, 2002.

LOPEZ, J. E. et al. Identification of novel antigenic proteins in a complex *Anaplasma marginale* outer membrane immunogen by mass spectrometry and genomic mapping. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8109-8118, 2005.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária. Campo Grande, **Embrapa Gado de Corte**, 2001. 360p.

MARANA, E. R. M. et al. 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 de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 20-26, 2009

MARCELINO, I. et al. Tick-borne diseases in cattle: Applications of proteomics to develop new generation vaccines. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4232-4250, 2012.

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.

MCHARDY N. & SIMPSON R.M. Imidocarb dipropionate therapy in Kenyan anaplasmosis and babesiosis. **Tropical Animal Health Production**, v. 6, p. 63-70, 1974.

MEEUS, P. F. et al. Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogues of *Anaplasma marginale*. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 633-643, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Exportação. 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 21 Agosto 2012.

MOLAD T., et al. Molecular conservation of MSP4 and MSP5 in *Anaplasma marginale* and *A. centrale* vaccine strain. **Veterinary Microbiology**, v. 20, n.1-2, p 55-64, 2004.

MOLLOY, J. B. et al. Identification of antigenic differences that discriminate between cattle vaccinated with *Anaplasma centrale* and cattle naturally infected with *Anaplasma marginale*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 179-186, 2001.

MOLLOY, J. B. et al. Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 4, p. 245-249, 1999.

MONTENEGRO-JAMES, S. et al. Use of the dot enzyme-linked immunosorbent assay with isolated *Anaplasma marginale* initial bodies for serodiagnosis of anaplasmosis in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 10, p. 1518-1521, 1990.

MOREL, P. C. Manual of tropical veterinary parasitology. Wallingford, UK: CAB International, 1989. 473p.

MUNDERLOH, U. G. et al. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. **Veterinary Microbiology**, v. 101, n. 1, p. 53-64, 2004.

NIU, H. et al. *Anaplasma phagocytophilum* Ats-1 is imported into host cell mitochondria and interferes with apoptosis induction. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 2, p. e1000774, 2010.

NOH, S. M. et al. Composition of the surface proteome of *Anaplasma marginale* and its role in protective immunity induced by outer membrane immunization. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 5, p. 2219-2226, 2008.

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

OBERLE, S. M. et al. Molecular size variations in an immunoprotective protein complex among isolates of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 6, p. 1567-1573, 1988.

OHASHI, N. et al. Immunodominant major outer membrane proteins of *Ehrlichia chaffeensis* are encoded by a polymorphic multigene family. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 1, p. 132-139, 1998.

OLIVEIRA J.B. et al. Antigenic characterization of Brazilian isolates of *Anaplasma marginale*. [Memórias do Instituto Oswaldo Cruz](#), v,98 n 3, 2003.

OLIVEIRA, R. L. et al. Nutrição e manejo de bovinos de corte na fase de cria. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, n.1, p. 57 - 86. 2006. Disponível em: <<http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/706/451>>. Acesso em: 1 Jul.2012.

PACHECO, C. R. et al. Dinâmica da infecção natural pelo *Anaplasma marginale* em vacas e bezerros da raça Holandesa, na região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 3, 2004.

PALMER, G. H. Sir Arnold Theiler and the discovery of anaplasmosis: a centennial perspective. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 76, n. 1, p. 75-79, 2009.

PALMER, G. H.; BANKHEAD, T.; LUKEHART, S. A. 'Nothing is permanent but change'- antigenic variation in persistent bacterial pathogens. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 1697-1705, 2009a.

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.

PALMER, G. H. et al. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 7, p. 281-286, 1999.

PALMER, G. H. et al. The immunoprotective *Anaplasma marginale* major surface protein 2 is encoded by a polymorphic multigene family. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 9, p. 3808-3816, 1994.

PALMER, G. H. et al. Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. **Science**, v. 231, n. 4743, p. 1299-1302, 1986.

PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. **The Journal of Immunology**, v. 133, n. 2, p. 1010-1015, 1984.

POTGIETER, F. T.; VAN, R. L. The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies and incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. **Onderstepoort Journal of Veterinart Research**, v. 54, n. 4, p. 557-560, 1987.

POTGIETER, F. T.; VAN, R. L. Infectivity virulence and immunogenicity of *Anaplasma centrale* live blood vaccine. **Onderstepoort Journal of Veterinart Research**, v. 50, n. 1, p. 29-31, 1983.

POTGIETER, F. T.; VAN, R. L. The effect of incubation and prefeeding of infected *Rhipicephalus simus* nymphae and adults on the transmission of *Anaplasma marginale*. **Onderstepoort Journal of Veterinart Research**, v. 49, n. 2, p. 99-101, 1982.

POTGIETER, F. T. Epizootiology and control of anaplasmosis in south africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 50, n. 4, p. 367-372, 1979.

RICHEY, E. J. and PALMER, G. Bovine Anaplasmosis. In: American Association of Bovine Practitioners, Proceedings American Association of Bovine Practitioners Annual Conference. n. 24, 1992.

RIKIHISA, Y.; LIN, M.; NIU, H. Type IV secretion in the obligatory intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 1213-1221, 2010.

RIKIHISA, Y. The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. **Clinical Microbiology Reviws**, v. 4, n. 3, p. 286-308, 1991.

RISTIC, M.; CARSON, C. A. Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 93, p. 151-188, 1977.

RISTIC, M.; SIBINOVIC, S.; WELTER, C. J. An attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. **Proceedings Annual Meeting United States Animal Health Association**, v. 72, p. 56-69, 1968.

RISTIC, M. Studies of anaplasmosis. I. Filtration of the causative agent. **American Journal of Veterinary Research**, v. 21, p. 890-894, 1960.

ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. Doenças Infecciosas: Diagnóstico Molecular. Editora Guanabara Koogan. 2006. 25p.

RODRIGUEZ, S. D. et al. Molecular epidemiology of bovine anaplasmosis with a particular focus in Mexico. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 1092-1101, 2009.

ROGERS, R. J. et al. Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced in vivo against bovine babesiosis and anaplasmosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, n. 9, p. 285-287, 1988.

SACCO, A. M. S. Controle/Profilaxia da Tristeza Parasitária Bovina. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Comunicado Técnico n. 38, 2001. Disponível em: <
<http://www.cppsul.embrapa.br/unidade/publicacoes/publicacao/4#PUBLICACOES>>
Acesso em: 30 Ago. 2012.

SAMBROOK J. & RUSSEL D.W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.

SCOLES, G. A.; MILLER, J. A.; FOIL, L. D. Comparison of the efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae) with mechanical transmission by the horse fly, *Tabanus fuscicostatus* Hine (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 1, p. 109-114, 2008.

SHKAP, V. et al. Experimental transmission of field *Anaplasma marginale* and the *A. centrale* vaccine strain by *Hyalomma excavatum*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* ticks. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 3-4, p. 254-260, 2009.

SHKAP, V. et al. Concomitant infection of cattle with the vaccine strain *Anaplasma marginale* ss *centrale* and field strains of *A. marginale*. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 3-4, p. 277-284, 2008.

SHKAP, V. et al. Detection of the *Anaplasma centrale* vaccine strain and specific differentiation from *Anaplasma marginale* in vaccinated and infected cattle. **Parasitology Research**, v. 88, n. 6, p. 546-552, 2002.

SHKAP, V. et al. Identification of immunodominant polypeptides common between *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*. **Journal of Medical Entomology**, v. 29, n. 1-2, p. 31-40, 1991.

SMITH, T. and KILBORNE, F. L. Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever. Washington: USDA, 1893. 301p.

SOUZA, J. C. P. et al. Prevalência de anticorpos anti *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) em bovinos na mesorregião do médio Paraíba. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 309-314, 2001.

SOUZA, J. C. P. et al. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 97-101, 2000.

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

TIZARD, I. R. *Imunologia Veterinária – Uma introdução*. São Paulo: Roca 2002, 532p.

THEILER, A. *Anaplasma marginale* (gen. spec. nov.). The marginale points in the blood of cattle suffering from a specific disease. In: A.Theiler (ed.), Report of the government veterinary bacteriologist, 1908–9. Transvaal- South Africa, 1910, p. 7–64.

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

THEILER, A. Gallsickness of imported cattle and the protective inoculation against this disease. **Agricultural Journal of the Union of South Africa**, 1912, v. 3, p. 7– 46.

TORIONI DE, E. S. et al. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 777-782, 1998.

UETI, M. W. et al. Identification of midgut and salivary glands as specific and distinct barriers to efficient tick-borne transmission of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 6, p. 2959-2964, 2007.

VIDOTTO, M. C. et al. Intermolecular relationships of major surface proteins of *Anaplasma marginale*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 7, p. 2940-2946, 1994.

VIDOTTO, M.C. et al. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in cattle in Parana state, Brazil, by MSP-5 competitive ELISA. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.849, p.424-426, 1998.

VIDOTTO, O. e MARANA, M. R. E. Diagnóstico em Anaplasmoze bovina – Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**. v. 31 n. 2. 2001.

VILJOEN, G. J.; NEL, L. H.; CROWTHER, J. R. Molecular diagnostic PCR handbook. Netherlands: Springer Link, 2005. 307p.

VIRESHAKUL, N. et al. Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale*. **Gene**, v. 253, n. 1, p. 45-53, 2000.

VISSER, E. S. et al. 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. et al. Infectivity of three *Anaplasma marginale* isolates for *Dermacentor andersoni*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 96-99, 1987.

WILSON, A. J. Observations on the pathogenesis of anaplasmosis in cattle with particular reference to nutrition, breed and age. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 50, n. 4, p. 293-295, 1979.

WHITTIER, D.; CURRIN, N.; CURRIN, F. J. Anaplasmosis in Beef Cattle. Virginia Cooperative Extension. In: Communications and Marketing, College of Agriculture and Life Sciences, 2009.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) 2012: Chapter 2.4.1 Bovine Anaplasmosis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012. pp. 1-11. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.01_BOVINE_ANAPLASMOSIS.pdf>. Acesso em: 29 Jun. 2012.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) 2008: Chapter 1.1.8 . Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. In: Principles of Veterinary vaccine production. 6th edn. pp. 90 – 104. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.08_VACCINE_PRODUCTION.pdf>. Acesso em: 29 Ago.2012.

ZAUGG, J. L. et al. Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *A. ovis*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 32, n. 1, p. 62-66, 1996.