

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

**TESE**

**Caracterização e importância da Tristeza Parasitária Bovina e estudo da variabilidade genética de *Anaplasma marginale* Theiler, 1910 em bezerros da região noroeste de Minas Gerais, Brasil**

**Michele Bahia do Vale Silva**

**2019**



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

**CARACTERIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA DA TRISTEZA PARASITÁ-  
RIA BOVINA E ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Ana-  
plasma marginale* THEILER, 1910 EM BEZERROS DA REGIÃO NORO-  
ESTE DE MINAS GERAIS, BRASIL**

**MICHELE BAHIA DO VALE SILVA**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Adivaldo Henrique da Fonseca**

*Sob a co-orientação do Professor (a)*  
**Cláudia Bezerra da Silva**

**Jenevaldo Barbosa da Silva**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Seropédica, RJ  
Outubro de 2019

586c SILVA, MICHELE BAHIA DO VALE, 1990-  
Caracterização e importância da Tristeza Parasitária  
Bovina e estudo da variabilidade genética de  
Anaplasma marginale Theiler, 1910 em bezerros da  
região noroeste de Minas Gerais, Brasil / MICHELE  
BAHIA DO VALE SILVA. - Seropédica, 2019.  
67 f.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.  
Coorientador: Cláudia Bezerra da Silva.  
Coorientador: Jenevaldo Barbosa da Silva.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS, 2019.

1. rebanho leiteiro. 2. carrapato. 3. babesiose.  
4. anaplasmoses. 5. msp1?. I. Fonseca, Adivaldo  
Henrique da, 1953-, orient. II. Silva, Cláudia  
Bezerra da, 1984-, coorient. III. Silva,  
Jenevaldo Barbosa da, 1984-, coorient. IV  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS. V.  
Titulo.

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

MICHELE BAHIA DO VALE SILVA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências,  
no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 02/12/2019



Adivaldo Henrique Da Fonseca, Dr. UFRRJ  
(Orientador)



Fábio Jorge Moreira da Silva, Dr. UFRJ



Joice Aparecida Rezende Vilela Dr<sup>a</sup>. EMATER-RIO



Carlos Luiz Massard Dr. UFRRJ



Huarrisson Azevedo Santos Dr. UFRRJ



Maristela Peckle Peixoto, Dr<sup>a</sup>. UFRRJ

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais, Miguel Borboleta e Joana Darc,  
À minha irmã Tatiane Bahia,  
À minha vó Angelina Bahia.  
In memória ao meu querido amigo Gabriel Ferreira**

## AGRADECIMENTOS

Eu agradeço a Deus e aos espíritos de luz que estiveram comigo nesta caminhada e me deram forças para continuar até o fim e concluir essa importante etapa da minha vida.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por ter sido minha morada e me acolhido nesses quatros anos, pelas suas vivências terem me permitido melhorar como profissional e ser humano.

Agradeço ao meu orientador Adivaldo Fonseca, pela confiança e paciência nestes quatro anos de doutorado. Professor o senhor é um exemplo de vida para mim.

A professora Marília por sempre me receber de braços abertos e com muito carinho na sua casa.

A Meu co-orientador professor Jenevaldo Barbosa, o seu apoio foi crucial para execução desse projeto, obrigada pela ajuda durante as visitas nas propriedades, pelas orientações presenciais, por telefone, pelo email e pela paciência que teve comigo, você é um exemplo de professor.

À minha Co-orientadora professora Cláudia Bezerra, por toda paciência que teve comigo durante o doutorado, por ter me guiado com suas orientações em diversos momentos. Você é uma inspiração como profissional e ser humano.

Aos proprietários das fazendas que abriram as porteiras para a realização deste estudo. Em especial aos proprietários Valdiney, Lourenço, Albert e Hyali. Aos animais do presente estudo que contribuíram para esta pesquisa. Muito obrigada.

Aos amigos e colegas de Laboratório de Doenças Parasitárias, tanto pela ajuda na execução deste trabalho como pela amizade que se formou no convívio diário: Isabela Mesquita, Priscila Nunes, José Luis, Matheus Cordeiro, Juliana Ferreira, Carol Marotta, Marcio Barizon, Patrícia Barizon, Jaque Valim. Aos estagiários do LDP em especial a Thays, Priscila, Leticia e Yasmin.

A Neide por seu carinho e ajuda na manutenção do laboratório de doenças parasitárias.

À professora Natalie pela ajuda com a realização dos sequenciamentos das amostras da presente tese.

Ao programa de pós-graduação em ciências veterinárias da UFRRJ e aos professores que fazem pesquisa e ensino com muita qualidade, mesmo com as dificuldades atuais do nosso país em relação a educação. Em especial aos professores Carlos Wilson e Carlos Massard.

Ao professor Huarisson de Azevedo por sempre ser disponível em relação as dúvidas de biologia molecular.

Aos funcionários da UFRRJ em especial ao secretário do programa de pós-graduação de ciências veterinárias Artur e a técnica do laboratório de biologia molecular Tassia Furtado pela disponibilidade e prestatividade nos momentos que precisei de auxílio.

Aos alunos da Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri do curso de Medicina veterinária, especialmente Jullyana, Lucas, Bruno e Wilham pela ajuda durante a coleta de sangue dos animais nas propriedades e processamento das amostras.

As técnicas da UFVJM do laboratório Multidisciplinar de ciências Básicas II Débora e Fátima pela prestatividade nos momentos que precisei.

Aos amigos que tornaram o processo de doutorado mais leve com muitas risadas e momentos leves; Thiago, Paulo César, Adilton, Grazi, Pedro e Cássio.

À amiga Nira juntamente com seu esposo Pablo por sempre ter me acolhido quando precisei no Rio, você foi uma irmã que encontrei aqui. Obrigada por tudo.

As meninas do alojamento feminino da pós da UFRRJ, por compartilharem diariamente as alegrias e tristezas, e tornar o processo da finalização do doutorado mais leve.

In memoriam ao meu amigo Gabriel Ferreira (Bié), você foi exemplo de bondade e lealdade. Obrigada pela amizade de quase trinta anos.

Eu agradeço aos meus pais Miguel Borboleta e Joana Darc pela compreensão dos momentos que estive ausente, pelo apoio, amor incondicional, pela educação, pelo exemplo de trabalho e honestidade. Eu amo vocês.

À minha irmã Tatiane Bahia pela amizade, por me ajudar com a estatística deste trabalho, por todo seu carinho e por ter andado comigo até aqui. Te amo maninha.

À minha vó Angelina por todo exemplo de vida e de fé, por todo afeto e por ser um porto seguro para nossa família. Muito obrigada minha linda.

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

## BIOGRAFIA

**Michele Bahia do Vale Silva**, filha de Miguel Borboleta da Silva Neto e Joana Darc Bahia do Vale Silva, nasceu em 19 de julho de 1990 no município de Belém, Estado do Pará. Coursou o ensino fundamental e médio em escolas públicas do município de Castanhal, estado do Pará (Latif Ronald Oliveira Janete, Padre Salvador Traccaiolli e Lameira Bittencourt).

No ano de 2008 ingressou no curso de Bacharelado em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará. Durante a graduação realizou estágios em diferentes áreas, integrando projetos de pesquisa e extensão universitária, principalmente na área de parasitologia animal, especialmente no Laboratório de Parasitologia Animal. Foi bolsista em 2009 de atividade acadêmica pela Pró-Reitoria de extensão da UFPA (Proex – PA) em 2010 pelo programa institucional de bolsas de iniciação científica – PIBIC/ FAPESPA. Em 2011 foi bolsista pelo programa do centro de Desenvolvimento tecnológico da Universidade de Brasília pelo Programa de Manejo de Avifauna nos Aeroportos Brasileiros, realizando atividades no aeroporto de Val de Cans, Belém, Pará. Em abril de 2013 obteve o título de médica veterinária. No mesmo mês ingressou no programa de pós-graduação em saúde animal na Amazônia da UFPA, área de concentração Saúde Animal, em nível de mestrado. Onde foi bolsista CAPES.

Em agosto de 2015 ingressou no programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, da UFRRJ, modalidade doutorado, sendo bolsista CAPES. Em 2017 foi aprovada no processo seletivo para docente substituto da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri para as disciplinas de Fisiologia Animal e Patologia Animal, encerrando o contrato no mesmo ano. Nesta data, apresenta e defende esta tese como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração em Ciências Veterinárias.



## RESUMO GERAL

SILVA, Michele Bahia do Vale. **Caracterização e importância da Tristeza Parasitária Bovina e estudo da variabilidade genética de *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) em bezerros da região noroeste de Minas Gerais, Brasil.** 2019. 67 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Este trabalho está dividido em dois capítulos e tem por objetivos: 1) Caracterizar a importância da rickettsia *Anaplasma marginale* e dos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* na ocorrência do complexo da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) em bezerros na região Noroeste de Minas Gerais 2) avaliar a relação entre a diversidade genética de *A. marginale* e a ocorrência de surtos de anaplasmoses em bezerros da mesma região. No primeiro capítulo foram coletadas 300 amostras sanguíneas de bezerros e após extração de DNA foi realizada Nested-PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores que amplificam fragmentos dos genes *sbp-4* (*B. bovis*) e *rap-1a* (*B. bigemina*) e a Semi-Nested para o gene *msp5* (*A. marginale*). Esfregaços sanguíneos foram confeccionados destes animais. A prevalência de *A. marginale* foi de 55,66% (167/300), *B. bigemina* 15,33% (46/300) e *B. bovis* 4,0% (12/300) nos animais examinados por técnicas de PCR. Formas parasitárias de *A. marginale* e *B. bigemina* foram encontradas em 36,33% e 2,66% dos esfregaços sanguíneos, enquanto *B. bovis* não foi detectado. As taxas de infecções por faixa etária no grupo 1 (10-70 dias) de bezerros foram de 41,12%, 26,16% e 3,73% para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*, respectivamente. Enquanto no grupo 2 (> 70-300) as prevalências foram de 63,73%, 9,32% e 4,14% para os mesmos agentes, respectivamente. Foram examinados 15 animais com febre, perda de peso, mucosas hipocoradas, icterícia e anemia, sendo confirmados posteriormente por nested-PCR a infecção simples por *A. marginale*, todos animais pertenciam ao grupo 2. Para o segundo capítulo foram selecionados 30 bezerros previamente positivos (gene *msp5*) para *A. marginale* com infecção assintomática (n=24) e aguda (n=6) para o estudo da diversidade genética através da semi-nested PCR com alvo no gene *msp1a*. Após o sequenciamento das amostras foi determinado o genótipo e estruturas em tandem repeats. Treze diferentes estirpes foram encontradas  $\alpha\beta\beta\beta$  (9 animais),  $\tau$  27 18 (3 animais),  $\alpha\beta\beta$  BRA1 31 (3 animais),  $\alpha$  22 13 18 (3 animais), 80 FFFF (2 animais),  $\alpha$  22 13 13,  $\alpha\beta\beta\Gamma$ ,  $M\phi\phi\phi\phi F$ , 42 25 25 31, QQQM, BQBQBM, 1617FF (um animal cada). O genótipo E foi predominante em 93,33% das amostras (28/30), seguidos pelos os genótipos C (3,33%) e G (3,33%). Uma nova estrutura repetida em tandem foi descrita no presente trabalho nomeada BRA 1 (TDSSSASGVLSQSGQASTSSQLG). A estirpe  $\alpha\beta\beta\beta$  esteve presente em seis animais com sinais clínicos de anaplasnose aguda com sinais clínicos de febre, perda de peso, icterícia e anemia. No Rebanho bovino estudado a anaplasnose é a principal causa de Tristeza Parasitária bovina. Alta diversidade genética de *A. marginale* ocorreu em animais persistentemente infectados. Entretanto durante surtos de anaplasnose bovina foi observada baixa diversidade genética. A estirpe  $\alpha\beta\beta\beta$  na região noroeste de Minas Gerais foi associada a anaplasnose aguda. O genótipo E foi predominante.

**Palavras chaves:** Rebanho leiteiro, carrapatos, babesiose, anaplasnose, *msp1a*.

## GENERAL ABSTRACT

SILVA, Michele Bahia do Vale. **Characterization and importance of Cattle Tick Fever and study of the genetic variability of *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) in calves from the northwestern region of Minas Gerais, Brazil. 2019.** 67 p. Thesis (Doctor Science in Veterinary). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

This work is divided into two chapters and aims 1) to characterize the importance of rickettsia *Anaplasma marginale* and the protozoan parasites *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in the occurrence of cattle tick fever (CTF) among calves in the Northwest region of Minas Gerais and 2) to evaluate the relationship between *A. marginale* genetic diversity and the anaplasmosis outbreaks occurrence in dairy farms same region. In the first chapter, Blood samples from 300 calves were collected and after DNA extraction Nested-PCR was performed using oligonucleotide primers that amplified fragments of the genes *sbp-4* (*B. bovis*) and *rap-1a* (*B. bigemina*) and Semi-Nested for the gene *msp5* (*A. marginale*). Blood smears were made from these animals. The prevalence of *A. marginale* 55,66% (167/300), *B. bigemina*. 15,33% (46/300) and *B. bovis* 4,0 % (12/300) of calves examined by techniques of PCR. Parasitic forms of *A. marginale* and *B. bigemina* were found in 36,33% and 2,66% of the blood smears while *B. bovis* was not detected. Infection rates by age in group 1 (10-70 days) were 41.12%, 26.16% and 3.73% for *A. marginale*, *B. bigemina* and *B. bovis*, respectively. While in group 2 (> 70-300 days) the prevalences were 63.73%, 9.32% and 4.14% for the same agents, respectively. Fifteen animals with fever, weight loss, jaundice and anemia were examined and nested-PCR confirmed the simple infection by *A. marginale*. For chapter II, Thirty previously positive calves (*msp5* gene) for *A. marginale* with asymptomatic (n = 24) and acute (n = 6) infection were selected for the study of genetic diversity through semi-nested PCR targeting the *msp1 $\alpha$*  gene. After sequencing of the samples, the genotype and tandem repeats structures were determined. Thirteen different strains were found: :  $\alpha\beta\text{FFF}$  (9 animals), 13 27 27 (3 animals),  $\tau$  27 18 (3 animals),  $\alpha\beta\beta$  195 31 (3 animals),  $\alpha$  22 13 18 (3 animals), 80 FFFF (2 animals),  $\alpha$  22 13 13,  $\alpha\beta\beta\Gamma$ ,  $M\phi\phi\phi\phi F$ , 42 25 25 31, QQQM, BQBQBM, 1617FF (1 animal each). Genotype E was predominant in 93.33% of the samples (28/30), followed by genotypes C (3.33%) and G (3.33%). A new repeated tandem structure was described in the present work named BRA 1 (TDSSSAS-GVLSQSGQASTSSQLG). The  $\alpha\beta\text{FFF}$  strain was present in six febrile animals that showed clinical symptoms of anaplasmosis like weight loss, jaundice and anemia. In the bovine herd studied anaplasmosis is the main cause of CTF. High genetic diversity of *A. marginale* occurred in persistently infected animals. However, during outbreaks of bovine anaplasmosis, low genetic diversity was observed. The  $\alpha\beta\text{FFF}$  strain in northwestern Minas Gerais was associated with acute anaplasmosis. Genotype E was predominate.

**Keywords:** Dairy herd, ticks, babesiosis, anaplasmosis, *msp1 $\alpha$*

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Descrição das propriedades e bezerros avaliados na região noroeste de Minas Gerais, Brasil.....18

**Tabela 2.** Conjuntos de primers específicos para os genes de *A. marginale* (*msp5*), *B. bovis* (*sbp-4*) e *B. bigemina* (*rap-1a*) utilizando semi-nested PCR (snPCR) e nested-PCR (nPCR).....21

**Tabela 3.** Frequência de positividade dos agentes da TPB em 300 bezerros da região noroeste de Minas Gerais, Brasil.....24

**Tabela 4.** Frequência de positividade dos agentes *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* em bezerros de fazendas leiteiras do noroeste de Minas Gerais, Brasil.....24

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Descrição das características das propriedades e número de bezerros que testaram positivos pelo gene *msp5* para *A. marginale* avaliados na região noroeste de Minas Gerais, Brasil.....39

**Tabela 2.** Isolados de *A. marginale* encontrados em bezerros na região noroeste de Minas Gerais, Brasil.....43

**Tabela 3.** Diferença entre estirpes encontradas em bezerros da Fazenda 1 do noroeste de Minas Gerais, Brasil.....44



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**Figura 1.** Esfregaços sanguíneos de bovinos corados com GIEMSA. A) Presença de trofozoíto e merozoítos de *B. bovis* (seta preta), escala 10 µm. B) Presença de merozoítos de *B. bigemina* (seta vermelha), escala 10 µm. Fonte: Mosqueda et al. (2012) C) Corpúsculos intraeritrocitários de *A. marginale* (seta verde), escala 20 µm. Fonte: Arquivo pessoal.....02

**Figura 2.** Mapa de distribuição geográfica do carrapato *R.(B.) microplus* nas Américas; pontos em preto indicam a presença do carrapato, desde o norte da Argentina até o México, Incluindo as Ilhas do Caribe (BARROS-BATTESTI et al., 2006).....04

**Figura 3.** A) Bezerro que veio ao óbito por TPB (anaplasmose), em uma propriedade rural leiteira de Unaí, Minas Gerais anterior ao presente estudo. Diagnóstico confirmado pelos achados de necropsia e esfregaço sanguíneo. Durante a necropsia foi observado icterícia nos tecidos subcutâneos e nas serosas dos órgãos, hepatomegalia e vesícula biliar distendida (B, C e D). Fonte: Silva,J.B.....09

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Mapa de Minas Gerais, Brasil. As fazendas do presente estudo estavam localizadas nos municípios de Cabeceira Grande e Unaí, Região noroeste do estado de Minas Gerais ..... 17

**Figura 2.** Bezerras do grupo 1, fase de cria, em propriedades da região noroeste de Minas Gerais. A) Sistema argentino B) Sistema de casinhas..... 19

**Figura 3.** Bezerras do grupo 2, fase de recria, em propriedades da região noroeste de Minas Gerais. Nesta fase os animais recebiam silagem e ração concentrada no cocho e pastejavam *Brachiaria brizantha* (A e B).....20

**Figura 4.** Gel de agarose a 1,5 % com os produtos de amplificação da semi-nested PCR para detecção de DNA de *Anaplasma marginale* (gene *msp5*) em amostras de sangue de bezerras. Marcador de peso molecular de 100 pares de base (PM); Controle positivo (C+); Controle negativo (HD e HF); 01 – 106 amostras testes. Amostras positivas (01; 50; 57; 61; 64; 82; 104; 105; 106). Amostras negativas (56; 58; 63; 77; 94).....22

**Figura 5.** Gel de agarose a 1,5 % com os produtos de amplificação da nested PCR para detecção de DNA de *Babesia bigemina* (gene *rap-1a*) em amostras de sangue de bezerras. Marcador de peso molecular de 100 pares de base (PM); Controle positivo (C+); Controle negativo (HD e HF); 95 – 177 amostras testes positivas.....22

**Figura 6.** Gel de agarose a 1,5 % com os produtos de amplificação da nested PCR para detecção de DNA de *Babesia bovis* (gene *sbp-4*) em amostras de sangue de bezerros. Marcador de peso molecular de 100 pares de base (PM); Controle positivo (C+); Controle negativo (HD e HF); 86 – 276 amostras testes positivas.....23

**Figura 7.** Esfregaços sanguíneos de bezerros examinados na região noroeste de Minas Gerais corados com GIEMSA. A) Corpúsculos intraeritrocitários de *A. marginale* (seta azul), escala 3 µm. B) Presença de um par de merozoíto de *B. bigemina* (seta vermelha), escala 3 µm.....23

**Figura 8.** Bezerros com sinais clínicos de anaplasmose. Presença de membrana das mucosas oral e ocular hipocoradas (A e B) e mucosa vaginal ictérica (C).....25

## CAPÍTULO II

**Figura 1.** Nova sequência de MSP1α (nomeada BRA 1) de *A. marginale* encontrada em isolados de bezerros (AmMG 26; AmMG 64; AmMG 76) do Noroeste de Minas Gerais, Brasil.....44

**Figura 2.** Arvore filogenética mostrando a relação das estirpes do presente estudo com sequências de *A. marginale* de diferentes localizações geográficas com base nas sequências de *mSP1α* depositadas no Genbak.....45

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	01
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	02
2.1 Aspectos gerais de <i>B. bigemina</i> , <i>B. bovis</i> e <i>A. marginale</i> .....	02
2.2 Histórico.....	03
2.3 Epidemiologia.....	04
2.4 Ciclo biológico de <i>A. marginale</i> e <i>Babesia</i> spp.....	06
2.5 Outras formas de transmissão.....	07
2.6 Sinais Clínicos.....	07
2.7 Diagnóstico.....	07
2.8 Tratamento, Controle e Profilaxia.....	10
2.9 Proteínas Principais de superfícies de <i>A. marginale</i> .....	11
<b>CAPÍTULO I “Caracterização do complexo da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) em bezerros da região noroeste de Minas Gerais, Brasil</b> .....	13
<b>RESUMO</b> .....	14
<b>ABSTRACT</b> .....	15
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
2.1 Conformidades com as normas éticas.....	17
2.2 Rebanhos amostrados.....	17
2.3 Animais.....	19
2.4 Colheitas de amostras e esfregaços sanguíneos.....	20
2.5 Extração de DNA.....	20
2.6 Detecção molecular de <i>A. marginale</i> , <i>B. bovis</i> e <i>B. bigemina</i> .....	21
2.7 Análise Estatística.....	21
<b>3 RESULTADOS</b> .....	22
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	28
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	29
<b>CAPÍTULO II - Diversidade genética de <i>Anaplasma marginale</i> (Theiler, 1910) em bezerros naturalmente infectados em propriedades leiteiras da região noroeste de Minas Gerais, Brasil</b> .....	34
<b>RESUMO</b> .....	35
<b>ABSTRACT</b> .....	36

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
2.1 Conformidades com as normas éticas.....	38
2.2 Área de estudo e animais.....	38
2.3 Semi-nested PCR para o gene <i>msp1α</i> .....	40
2.4 Sequenciamento.....	40
2.5 Análise filogenética.....	40
2.6 Análise das estruturas de repetições em tandem e classificação dos genótipos.....	40
<b>3 RESULTADOS</b> .....	42
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	48
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	49
<b>3 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	53
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54
<b>ANEXOS</b> .....	61
Anexo I- Declaração de aprovação CEUA UFVJM.....	62
Anexo II- Declaração de aprovação CEUA UFRRJ.....	63
Anexo III- Declaração de consentimento.....	64
Anexo IV- Modelo de Ficha de coleta.....	65
ANEXO V - Concentrações de reagentes do MasterMIX.....	66
ANEXO VI- Condições de tempo, temperatura e número de ciclos para a PCR.....	67



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um complexo de enfermidades causadas pelos protozoários *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893), *Babesia bovis* (Babés, 1888) e pela rickettsia *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910), sendo transmitidos por carrapatos, esses agentes possuem nas Américas principalmente o vetor biológico *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (GUGLIELMONE, 1995; SOUZA et al. 2000). Além disso, *A. marginale* pode ser transmitido mecanicamente por moscas hematófagas ou iatrogenicamente por fômites contaminados com sangue de bovinos infectados (KOCAN et al., 2010) e transmissão transplacentária de vacas para bezerros (KESSLER, 2000; KARUNAKARAN et al., 2011).

A infecção é causada pelo desenvolvimento e multiplicação de *Babesia* spp. e *A. marginale* nas células sanguíneas e tem como sinais clínicos febre, anemia, icterícia, hemoglobinúria, parada ou redução da ruminação, sinais nervosos (característicos da babesiose por *B. bovis*) anorexia e prostração (KOCAN et al., 2004; SOUZA et al., 2000). Estas enfermidades são clinicamente e epidemiologicamente semelhantes e são responsáveis por perdas econômicas significantes na indústria bovina em todo o mundo (SOUZA et al., 2013; YSUF, 2017).

No Brasil a maioria das áreas são de estabilidade enzoótica para os agentes da TPB, onde o desenvolvimento do vetor ocorre durante todo o ano. Nesses rebanhos, são raros os casos de doença clínica devido à produção de anticorpos constantes. Entretanto, algumas áreas são de instabilidade enzoótica, em razão do desenvolvimento do carrapato vetor ser interrompido pelas condições climáticas ou ainda pelo uso intensivo de carrapaticidas, o que diminui a produção de anticorpos e possibilita a ocorrência de casos clínicos acompanhados de alta taxa de mortalidade (GONÇALVES, 2000).

Um dos marcadores utilizados para caracterização genética de linhagens e estudos filogenéticos de *A. marginale* são os genes que codificam as “Proteínas Principais de Superfície” (MSPs), que estão envolvidas nas interações entre hospedeiro e patógeno, e patógeno e carrapato (DE LA FUENTE et al., 2007).

A MSP1 é um heterodímero composto por dois polipeptídeos distintos, MSP1 $\alpha$  e MSP1 $\beta$ . A MSP1 $\alpha$  é codificada por uma cópia de gene simples, *mSP1 $\alpha$*  (ALLRED et al., 1990) e a análise das sequências repetidas dessa proteína tem identificado diferentes estirpes de *A. marginale* em todo o mundo (DE LA FUENTE et al., 2007; CABEZAS-CRUZ et al., 2013).

Estudos com isolados de *A. marginale* tem demonstrado uma ampla diversidade genética nos rebanhos de bovinos dos estados do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (VIDOTTO et al., 2006; BAËTA et al., 2015; MACHADO et al., 2015; SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2016). De acordo com Vidotto et al. (2006) o conhecimento sobre a diversidade genética das diferentes estirpes de *A. marginale* tem importância para a epidemiologia, virulência e desenvolvimento de vacinas contra a rickettsia. Baseado nisto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a importância da rickettsia *Anaplasma marginale* e dos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* na ocorrência do complexo da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) em bezerros na região Noroeste de Minas Gerais e avaliar a relação entre a diversidade genética de *A. marginale* e a ocorrência casos de anaplasmose nestes animais.

Os resultados alcançados na presente tese foram divididos em dois capítulos sendo o primeiro intitulado “Caracterização do complexo da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) em bezerros da região noroeste de Minas Gerais, Brasil” e o segundo intitulado “Diversidade genética de *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) em bezerros naturalmente infectados em propriedades leiteiras da região noroeste de Minas Gerais, Brasil

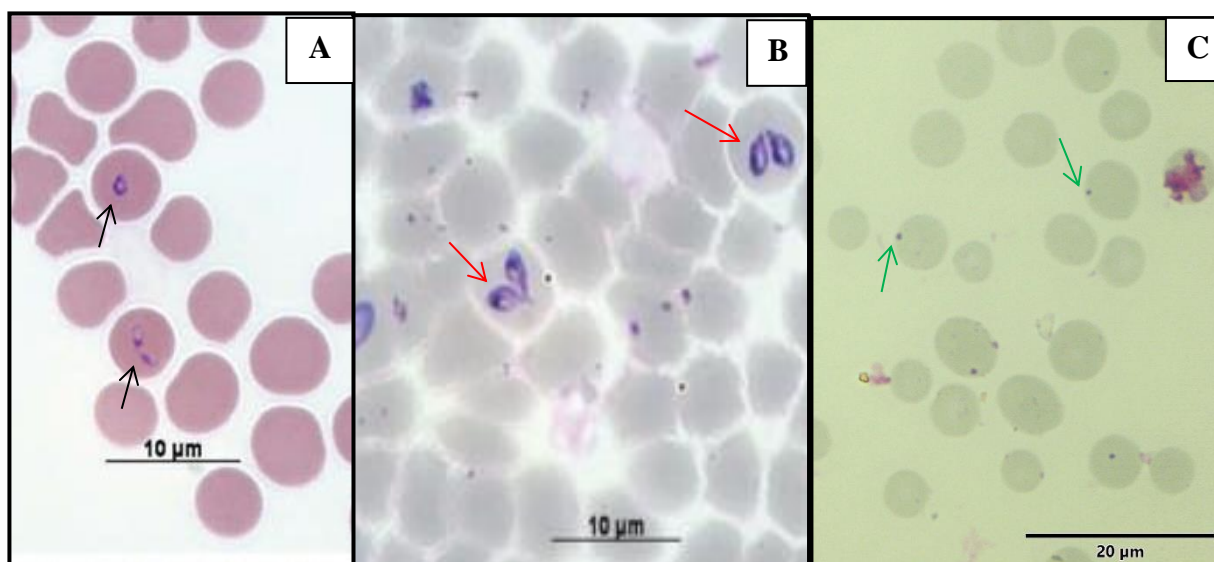
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais de *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e *Anaplasma marginale*

A infecção por *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale* é comumente observada em bovinos. Estes são os hospedeiros naturais dos agentes da Tristeza Parasitária Bovina, causando grandes prejuízos econômicos para a pecuária de países das regiões tropicais e subtropicais do mundo. Outras espécies de animais como búfalos, ovelhas, cabras, bisões, antílopes africanos e algumas espécies de cervos podem ser infectadas pelos agentes da TPB, no entanto com menor grau de patogenicidade (TONETTI et al., 2009; VATSYA et al., 2013; BERGGOETZ et al., 2014; EL-SIFY et al. 2015).

O gênero *Babesia* pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Aconoidasida, Ordem Piroplasmorida, Família Babesiidae. O filo Apicomplexa caracteriza-se pela presença de um complexo apical e citoesqueleto único e distinto de outros eucariotos. Os organismos são observados isoladamente ou em pares com extremidades estreitas opostas no interior das hemácias dos hospedeiros. São tipicamente piriformes, mas podem apresentar um aspecto redondo ou alongado. Esses protozoários são agrupados de acordo com o tamanho em pequenas babésias (1,0 – 2,5  $\mu\text{m}$ ) e grandes babésias (2,5 – 5  $\mu\text{m}$ ). A espécie *Babesia bigemina* tem aproximadamente 4,5 - 2,0  $\mu\text{m}$ , enquanto *Babesia bovis* 2,0 - 1,5  $\mu\text{m}$  (TAYLOR, 2017) (Figura 1 A e B).

Já *A. marginale* pertence ao Filo Proteobacteria, Classe Alphaproteobacteria, Ordem Rickettsiales, Família Anaplasmataceae (DUMLER et al. 2000; KOCAN et al., 2002). A bactéria *A. marginale* é gram-negativa e forma “corpúsculos de inclusão” violeta escuros, arredondados e pequenos, com aproximadamente 0,3 - 1,0  $\mu\text{m}$  dentro da hemácia, preferencialmente nas margens dessas células (TAYLOR, 2017) (Figura 1C).



**Figura 1.** Esfregaços sanguíneos de bovinos corados com GIEMSA. A) Presença de trofozoíto e merozoítos de *B. bovis* (seta preta), escala 10  $\mu\text{m}$ . B) Presença de merozoítos de *B. bigemina* (seta vermelha), escala 10  $\mu\text{m}$ . Fonte: Mosqueda et al. (2012) C) Corpúsculos intraeritrocitários de *A. marginale* (seta verde), escala 20  $\mu\text{m}$ . Fonte: Arquivo pessoal.

## 2.2 Histórico

Em 1888 um pesquisador chamado Victor Babes identificou microorganismos nos eritrócitos de bovinos na Romênia associada com hemoglobinúria bovina. Este pesquisador encontrou a mesma estrutura em hemácias de ovelhas. Posteriormente Smith e Kilborne (1893) identificaram e nomearam o agente da Febre do Texas em Bovinos nos Estados Unidos de *Pyrosoma bigeminum* e demonstraram que o agente era transmitido por carrapatos, sendo esta, a primeira descrição de um protozoário veiculado por esses artrópodes. No mesmo ano, Starcovici estudando os agentes descritos nomeou estes parasitas de *Babesia bovis*, *Babesia ovis* e *Babesia bigemina*, respectivamente, em homenagem a Babés (UILENBERG, 2006).

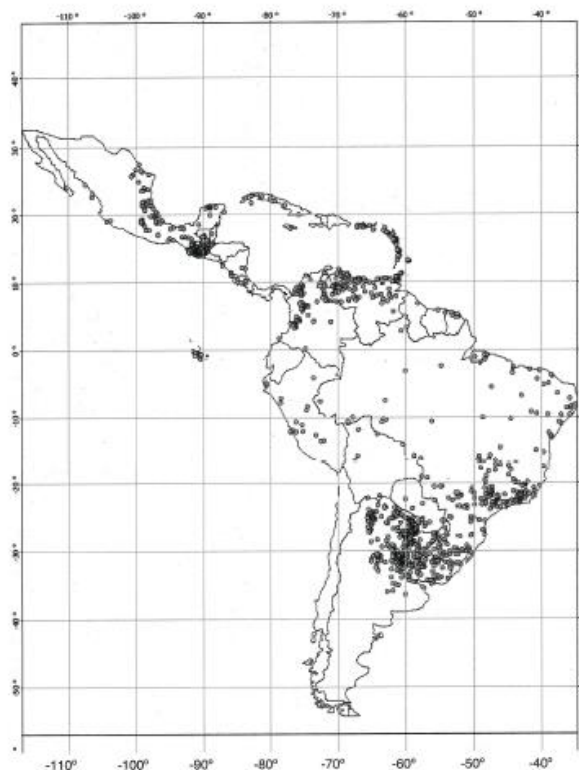
Os primeiros relatos sobre a infecção por *A. marginale* apareceram em 1893, quando Smith e Kilborne (1893) em estudo sobre carrapatos como vetores da febre do gado no Texas, detectaram a presença de inclusão nas células dos eritrócitos de bezerros e concluíram erroneamente que os "pontos marginais" faziam parte do ciclo de vida de *Babesia bigemina* (KOCAN et al., 2010).

Em 1910, Arnold Theiler fez a primeira descrição de *A. marginale* nas margens de eritrócitos de bezerros doentes oriundos da África do Sul. Theiler determinou corretamente que a babesiose e a anaplasiose eram doenças separadas que frequentemente coexistiam no mesmo animal; ele conseguiu separar os dois agentes e produzir "infecções puras" com *A. marginale*. Após o trabalho de Theiler, a anaplasiose foi amplamente reconhecida em zonas tropicais, subtropicais e muitas temperadas em todo o Velho Mundo (KOCAN et al., 2010).

No Brasil, em 1901, Farjado havia descrito *Babesia* spp. em bovinos importados e em fase de aclimação no Rio de Janeiro. Enquanto o primeiro registro de *Anaplasma marginale* foi por Carini em 1910 no estado de São Paulo (MARTINS & CORRÊA, 1995).

## 2.3 Epidemiologia

Nas Américas, a distribuição geográfica de bovinos infectados por *B. bovis* e/ou *B. bigemina* segue a dispersão do carrapato vetor *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Figura 2) espécie comum em áreas tropicais e subtropicais do mundo, e amplamente distribuída na África, Austrália e Américas do Sul e Central, enquanto que nos Estados Unidos a babesiose é uma doença exótica (GUGLIELMONE, 1995).



**Figura 2.** Mapa de distribuição geográfica do carrapato *R. (B.) microplus* nas Américas; pontos em preto indicam a presença do carrapato, desde o norte da Argentina até o México, incluindo as Ilhas do Caribe (Barros-Battesti et al., 2006).

A espécie *A. marginale* é distribuída mundialmente em regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo, Europa, África, Ásia e Austrália. Nos EUA, a anaplasmoze bovina é enzoótica em todos os estados do Atlântico Sul, Estados da Costa do Golfo e em vários estados do meio-oeste e oeste (GUGLIELMONE, 1995).

No Brasil, o principal transmissor da TPB é o *R. (B.) microplus*, onde este carrapato encontra condições favoráveis ao seu desenvolvimento. A intensidade de parasitismo varia em função das condições climáticas, do manejo de rebanhos e pastagens e da raça dos bovinos explorados (GOMES, 1998) podendo completar até cinco gerações por ano, dependendo das condições de umidade e temperatura da região (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

A situação epidemiológica da TPB no Brasil está relacionada às condições climáticas, que afetam diretamente o ciclo de vida livre do carrapato vetor, sendo que ocorrem três diferentes situações segundo Mahoney (1974) e Kessler & Schenk (1998):

- Áreas livres da doença, onde as condições climáticas são desfavoráveis ao desenvolvimento do carrapato, não ocorrendo TPB devido à ausência do vetor, os bovinos não desenvolvem imunidade natural.
- Áreas de instabilidade enzoótica, onde o ciclo do carrapato é interrompido por alguns meses devido às condições climáticas adversas, seja por baixas ou altas temperaturas. Há uma queda do nível de anticorpos contra os agentes da TPB pela falta de contato com agentes da enfermidade. Nessa situação existe a possibilidade de ocorrência de um grande número de casos clínicos, geralmente de curso agudo e com alta taxa de mortalidade (UILEMBERG, 1995).
- Áreas de estabilidade enzoótica, onde o desenvolvimento do vetor ocorre durante todo o ano, devido às condições climáticas favoráveis, existindo equilíbrio entre imunidade e a doença, sendo 75% dos animais com idade acima de nove meses portadores de hemoparasitos (GONÇALVES, 2000). Isso significa que a maior parte desses animais adquire a infecção ainda como bezerras, devido à queda de anticorpos colostrais contra *Babesia* e *Anaplasma* (GONÇALVES, 2000). Nesses rebanhos, são raros os casos de doença clínica e a maior parte do território brasileiro possui estabilidade endêmica.

Outros fatores influenciam a susceptibilidade dos animais aos agentes infecciosos da TPB, destacando-se: os animais *Bos taurus* são mais sensíveis aos carrapatos e assim às hemoparasitoses, enquanto o gado zebu é naturalmente mais resistente; os bovinos jovens são mais resistentes do que os adultos. Essa resistência decorre da presença de anticorpos colostrais, da rápida resposta da imunidade celular, maior eritropoiese da medula óssea e da presença de hemoglobina fetal nos eritrócitos. Sendo assim, a infecção precoce é importante devido a menor susceptibilidade dos animais jovens que apresentam quadros clínicos menos severos (GONÇALVES, 2000).

Além disso, o controle intensivo de carrapatos em algumas regiões é um importante fator criador de áreas de instabilidade enzoótica (VIEIRA et al., 2002). Em algumas situações é observada também condições de estabilidade enzoótica para anaplasmose em regiões onde o carrapato *R. (B.) microplus* não encontra condições adequadas para o seu desenvolvimento durante todo o ano. Isso pode ser explicado pela influência dos dípteros hematófagos na manutenção dessa situação epidemiológica (BARROS et al., 2005).

## 2.4 Ciclo biológico de *A. marginale* e *Babesia* spp.

O ciclo de *A. marginale* ocorre de forma coordenada com alimentação do carrapato vetor. Após a ingestão do sangue de bovinos portadores, *A. marginale* se desenvolve nas células do intestino médio do carrapato, e muitos outros tecidos são infectados, inclusive as glândulas salivares, local a partir do qual o agente etiológico da anaplasmose é transmitido para os bovinos durante o repasto sanguíneo do ixodídeo vetor (KOCAN et al., 2004).

Em cada local de infecção nos carrapatos, *A. marginale* se desenvolve dentro de vacúolos ligados à membrana, também chamados de colônias. A primeira forma de *A. marginale* observada dentro da colônia é a forma reticulada (vegetativa), que se divide por fissão binária formando grandes colônias que podem conter centenas de organismos. A forma reticulada altera-se em seguida para a forma densa, a qual representa a forma infecciosa e que pode sobreviver fora das células hospedeiras por um período limitado de tempo (KOCAN et al., 2010).

Os bovinos se tornam infectados quando as formas densas são transmitidas durante a alimentação dos carrapatos, via glândula salivar. Após a penetração nos eritrócitos, formam um vacúolo parasitóforo a partir da membrana da célula hospedeira, onde ocorre multiplicação de *A. marginale*, e cada inclusão (com até 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro) pode conter de quatro a 10 corpúsculos iniciais. O período de incubação da infecção, que varia de acordo com a dose infecciosa, é entre 7 a 60 dias, com uma média de 28 dias (KOCAN et al., 2010).

Os animais que sobrevivem à fase aguda da anaplasmose tornam-se portadores crônicos da doença, caracterizados por ciclos de baixas riquetsemias e tornam-se reservatórios de *A. marginale*, e pode permanecer por toda a vida do animal (ERIKS et al., 1993).

No ciclo de *Babesia* spp., os carrapatos infectados durante o repasto sanguíneo inoculam junto com saliva as formas esporozoítos, que entram na circulação e invadem eritrócitos do hospedeiro bovino. As formas parasitárias intraeritrocitárias largas são chamadas de trofozoítos e ocorre divisão por fissão binária e formam-se dois, ou às vezes quatro formas denominadas merozoítas. Por fim, a célula hospedeira rompe-se e os parasitas são liberados, penetrando em novos eritrócitos (BOCK et al., 2004; UILENBERG, 2006).

Alguns merozoítos dentro das hemácias não sofrem divisão binária ou merogonia, e se diferenciam em micro e macrogametas que entram no ciclo sexual de desenvolvimento no carrapato (BOCK et al., 2004; UILENBERG, 2006).

A infecção dos carrapatos começa com a ingestão de células sanguíneas contendo os diferentes estágios, trofozoítas, merozoítas e gametócitos. No lúmen do intestino dos carrapatos, as formas trofozoítas e merozoítas são destruídas e apenas os gametócitos sobrevivem, alguns deixam os eritrócitos e se diferenciam corpos raiados, que se desenvolvem em gametas masculinos e femininos no intestino do carrapato (BOCK et al., 2004; UILENBERG, 2006).

Dentro de 2 a 4 dias, os gametas se fundem e formam um zigoto móvel, que então se transforma em um oocineto. O oocineto invade o epitélio intestinal para iniciar a divisão assexuada (esporogonia) e formar os esporocinetos. Estas formas são liberadas do intestino do carrapato e entram na hemolinfa para invadir outras células (POHL, 2013).

Nas fêmeas dos carrapatos os esporocinetos alcançam os ovários, dessa forma invadem os ovos e, em seguida, continuam a multiplicar-se nos tecidos das larvas eclodidas (BOCK et al., 2004; UILENBERG, 2006).

Quando as larvas se alimentam pela primeira vez os esporocinetos entram nos ácinos salivares e formam, em alguns dias, os esporozoítos infectantes. Para *B. bovis*, os esporozoítos podem ser encontrados nas glândulas salivares das larvas a partir do segundo dia da alimentação, não persistindo após o estágio larval. Diferentemente, para *B. bigemina*, os esporozoítos são encontrados apenas após o oitavo dia de fixação, quando os carrapatos já se encontram na fase de ninfa, e permanecem até o estágio adulto, caracterizando a transmissão transestadial

(HODGSON, 1992; BOCK et al., 2004). O período de incubação da babesiose varia entre 7 a 14 dias após o contato com o carrapato infectado (OIE, 2015).

## 2.5 Outras formas de transmissão

A via de transmissão mecânica de *A. marginale* através de dípteros hematófagos ocorre principalmente por *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans* e tabanídeos. A transferência de células sanguíneas infectadas por meio de partes bucais dos dípteros entre os animais ocorre com diferentes graus de sucesso (POTGIETER et al., 1981; FOIL et al., 1989; SCOLE et al., 2005).

A transmissão iatrogênica de *A. marginale* com uso de instrumentos cirúrgicos ou agulhas contaminadas com o agente durante cirurgias coletivas (descorna, castração) e vacinação também pode auxiliar na disseminação do agente nas propriedades rurais. Assim como transfusão de sangue de um hospedeiro infectado com *Babesia* spp. e *A. marginale* para um hospedeiro susceptível (KESSLER, 2000; PEREIRA et al., 2011).

Além disso, mais raramente é observada tanto para *Babesia* spp. quanto para *A. marginale* a ocorrência de transmissão vertical da vaca para o bezerro susceptível no rebanho, através da infecção transplacentária ou por contato com o sangue durante o parto. Os animais recém-nascidos podem desenvolver os sinais típicos da TPB, e inclusive ir à óbito (KESSLER, 2000; YERUHAM et al., 2003; BENESI et al., 1999; GRAU et al., 2013; KARUNAKARAN et al., 2011).

## 2.6 Sinais Clínicos

A ocorrência e a intensidade dos sinais de TPB dependem de fatores como: espécie, virulência dos agentes, inóculo e sensibilidade do hospedeiro. *B. bovis* é mais patogênica do que *B. bigemina*, devido às alterações vasculares que causa e ao acúmulo de hemácias parasitadas nos capilares cerebrais desencadeando o quadro clínico de Babesiose cerebral ou nervosa (ALMEIDA et al., 2006; SCHILD et al., 2008; ANTONIASSI et al., 2009).

Os principais sinais clínicos do bovino com TPB são hipertermia, anorexia, pêlos arrepiados, taquicardia, taquipnéia, redução dos movimentos ruminais, anemia, icterícia (mais frequente e intensa na anaplasnose), hemoglobínúria (mais intensa na babesiose por *B. bigemina*), prostração e redução ou suspensão da lactação (SOUZA et al., 2013).

Sinais nervosos de incoordenação motora, andar cambaleante, movimentos de pedalação e agressividade são característicos na babesiose por *Babesia bovis*, devido a consequência da adesão dos microcapilares cerebrais (ALMEIDA et al., 2006; SCHILD et al., 2008; ANTONIASSI et al., 2009).

## 2.7 Diagnóstico

O diagnóstico do complexo anaplasnose e babesiose deve levar em consideração os dados epidemiológicos, sinais clínicos, lesões observadas à necropsia e principalmente exames laboratoriais (COSTA et al., 2011). O esfregaço sanguíneo é um exame laboratorial de baixo custo baseado na identificação do agente através da visualização das formas parasitárias de *Babesia* spp. e *A. marginale* no interior das hemácias dos animais. A capacidade de detectar hemoparasitos varia conforme o estágio da doença. Durante a infecção aguda a parasitemia é elevada, no entanto durante a fase crônica os níveis de parasitemia dos agentes infecciosos reduzem drasticamente e dificultam o diagnóstico por meio desta técnica (DÓRIA et al., 2016).

O “*imprint*” tecidual ou citologia de decalque é indicado em casos de exame *post mortem*, quando há suspeita de parasitismo como causa do óbito, durante o procedimento a área lesionada é colocada sobre uma superfície de vidro, e as células superficiais lesionadas passam para a superfície da lâmina, sendo corada para observação em microscópico óptico (SANTOS et al., 2016). No exame *post mortem* o diagnóstico da infecção por *B. bovis* pode ser realizado através de “*imprints*” de tecido nervoso, em decorrência da infecção desta babesia induzir o sequestro de hemácias parasitadas pelos capilares cerebrais (OLIVEIRA et al., 2018).

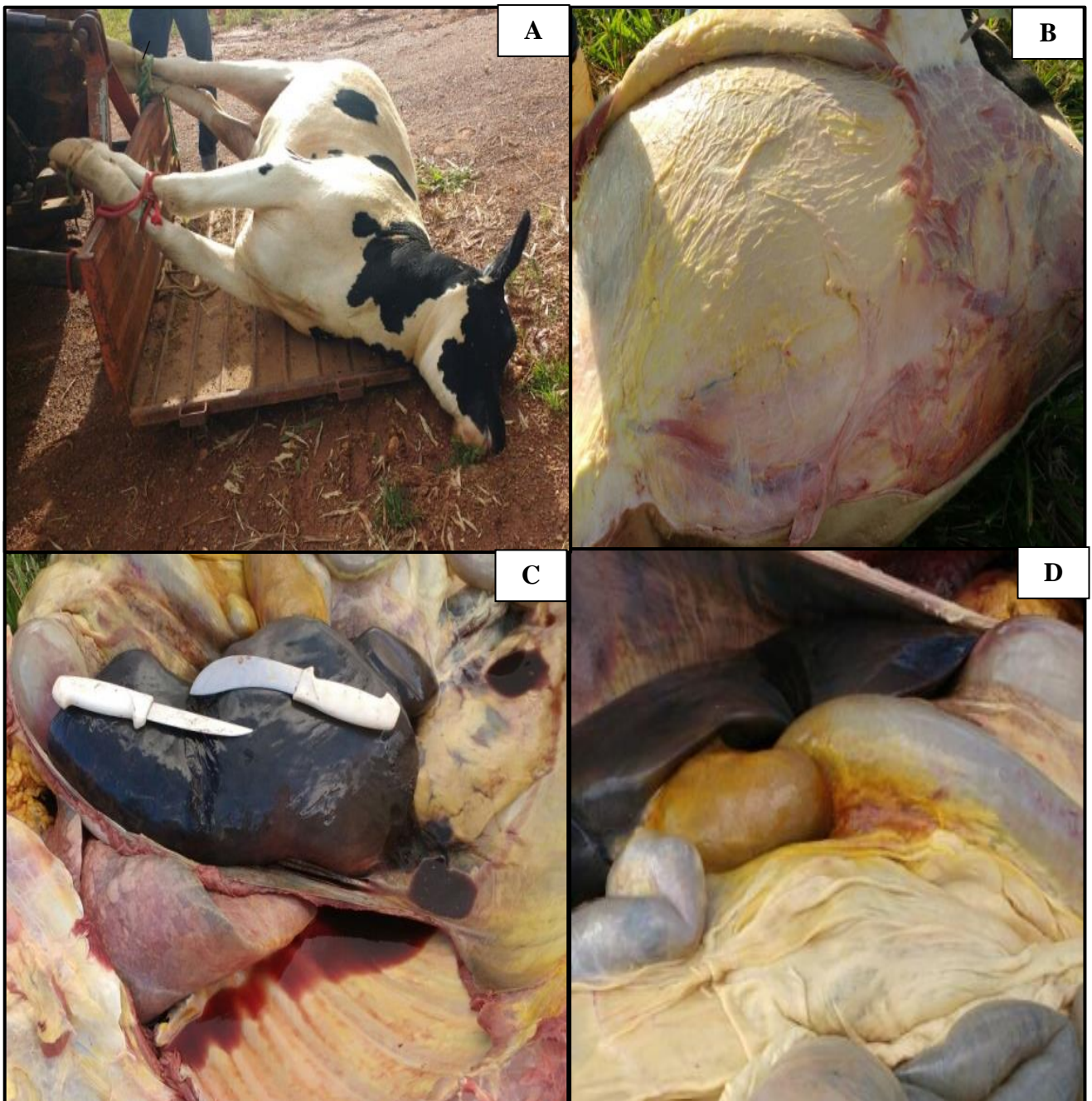
O diagnóstico indireto consiste na detecção de anticorpos contra *B. bigemina*, *B. bovis* e *A. marginale*. Vários testes sorológicos são usados para detecção da resposta contra os agentes da babesiose e anaplasmose, destacando-se os seguintes: o teste de congutinação rápida (RCT), Aglutinação em Latéx, Fixação do complemento (FC), Reação de imunofluorescência indireta (RIFI), Ensaio imunoenzimático indireto (ELISAI) e Ensaio imunoenzimático indireto competitivo (ELISAc) sendo a RIFI e o ELISAI as técnicas mais utilizadas no Brasil (MADRUGA, 2000; SANTOS et al., 2016).

Os testes sorológicos são ferramentas importantes para estudos epidemiológicos, as vantagens estão relacionadas a praticidade e baixo custo. Embora possuam elevada sensibilidade e especificidade, uma das principais limitações dos métodos sorológicos é que eles apenas indicam a exposição ao agente infeccioso, não informando sobre o curso da infecção (CAVALCANTE, 2007). Diversos métodos foram desenvolvidos nas últimas décadas para o diagnóstico molecular da TPB, destacando-se a PCR e suas variações (nested-PCR, semi-nested PCR, multiplex PCR, q PCR) (SANTOS et al., 2016). Métodos moleculares possuem um alto nível de sensibilidade e especificidade na identificação do DNA de *A. marginale* e *Babesia* spp., com capacidade de detecção precoce de infecções e determinação de portadores (FIGUEROA et al., 1993).

A PCR é capaz de amplificar milhares de cópias de uma região do DNA do agente pesquisado, as suas variações como nested-PCR, semi-nested PCR, têm sido desenvolvidas com a finalidade de elevar ainda mais a sensibilidade da técnica (PEREIRA, 2006). Na Nested-PCR o produto amplificado (amplicon) é submetido a uma segunda reação utilizando oligonucleotídeos iniciadores internos ao par utilizado na primeira reação. Enquanto a Semi nested - PCR na segunda reação utiliza apenas um novo oligonucleotídeo, sendo o outro oligonucleotídeo o mesmo da primeira reação. Estas alterações de ambas as técnicas permitem elevar a sensibilidade e especificidade (TORIONI DE ECHAIDE et al., 1998; TERKAWI et al., 2011).

Na necropsia de animais com TPB pode-se observar mucosas e serosas hipocoradas ou ictéricas, hepatomegalia, esplenomegalia, nefromegalia, congestão de diversos órgãos como fígado, baço, rins, cérebro e cerebelo, linfonodos aumentados, bile espessa e grumosa, vesícula biliar distendida e bexiga contendo urina escura (ALMEIDA et al., 2006) (Figura 3).





**Figura 3.** A) Bezerro que veio ao óbito por TPB (anaplasmosse), em uma propriedade rural leiteira de Unaí, Minas Gerais anterior ao presente estudo. Diagnóstico confirmado pelos achados de necropsia e esfregaço sanguíneo. Durante a necropsia foram observadas icterícia nos tecidos subcutâneos e nas serosas dos órgãos, hepatomegalia e vesícula biliar distendida (B, C e D). Fonte: Silva, J. B..

## 2.8 Tratamento, Controle e Profilaxia

Embora exista uma variedade de medicamentos com princípios ativos contra *Babesia* spp., atualmente no Brasil as principais drogas utilizadas para tratamento da babesiose são diaceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb. As doses recomendadas de diaceturato de diminazeno são 3-5 mg/kg por via intramuscular (IM), enquanto para dipropionato de imidocarb tem sido recomendado nas doses de 1-3 mg/kg por via subcutânea (SC) ou intramuscular (IM) para *Babesia* spp. (MOSQUEDA et al., 2012).

As tetraciclinas são os antibióticos de escolha para anaplasmoose aguda. A administração de oxitetraciclina intravenosa, 11mg/Kg uma vez ao dia por 3 a 5 dias é efetiva. Uma a duas administrações de oxitetraciclina de longa ação (LA) na dose de 20mg/Kg a intervalos de 72 horas também é efetiva no tratamento (NOVAS, 1982). O dipropionato de imidocarb também possui efeito sobre *A. marginale* em dose única a 2,5 mg/kg subcutâneo (ALBERTON et al., 2015). Além disso é recomendável nos animais enfermos com TPB tratamento suporte com drogas antiinflamatórias, vitaminas do complexo B, fluidoterapia e transfusão sanguínea em casos de anemia grave (MOSQUEDA et al., 2012).

O controle da população de vetores é uma das principais medidas de prevenção para os agentes da TPB, atualmente o principal método utilizado nas propriedades é o químico com uso de acaricidas, embora o uso contínuo e incorreto possa resultar em resistência em populações de moscas e carrapatos (KOCAN et al., 2000). Além disso, para manter a estabilidade endêmica de uma área, é necessário manter pelo menos uma população mínima de vetores para os animais serem desafiados imunologicamente (SMITH et al., 2000). Outros métodos alternativos de controle podem ser a rotação de pastagens bem como o controle biológico com uso de nematóides, bactérias e fungos (KESSLER e SCHENK, 1998).

A quimioprofilaxia também é um método utilizado nas propriedades rurais e consiste na aplicação de doses subterapêuticas de um medicamento para controlar os agentes da TPB em nível subclínico para evitar alta parasitemia e o animal portador lidar com a infecção. Uma das desvantagens da quimioprofilaxia é que o uso contínuo desses medicamentos pode levar a desenvolvimento de resistência de outras bactérias e protozoários. (RIBEIRO & PASSOS, 2002). Métodos de imunização tem apresentado sucesso no controle de surtos do complexo da TPB. O Brasil atualmente dispõe de apenas uma vacina licenciada (Vacina Embravac Hemo-par®), a qual é vendida refrigerada e, apenas, mediante encomenda. Esta vacina tem como base microrganismos vivos – cepa *A. centrale* para imunização contra *A. marginale* e cepas atenuadas de *B. bovis* e *B. bigemina*. (SANTOS et al., 2019).

A vacina é indicada para bovinos criados em áreas livres sempre que forem importados para áreas endêmicas. Ou ainda em áreas de instabilidade, quando os nascimentos coincidirem com o período livre de carrapatos, é recomendável que se vacine todos os bezerros, antes que o carrapato reapareça. (SANTOS et al., 2019).

Nas áreas de estabilidade endêmica, somente é recomendável a vacinação ao importar animais de áreas livres ou de instabilidade endêmica. A vacinação deve ser realizada antes dos 9 meses de idade, quando os animais são mais resistentes. Vacas prenhes não devem ser vacinadas, pois o risco de aborto é alto. (SANTOS et al., 2019).

## 2.9 Proteínas Principais de superfície de *A. marginale*

Um dos fatores que contribuem para o difícil controle da anaplasose bovina é a grande diversidade antigênica e genética encontrada em estirpes de uma região para outra, dentro do mesmo rebanho e até mesmo dentro do mesmo animal (DE LA FUENTE et al., 2001b; PALMER et al., 2004; VEGA et al., 2007; CASTANEDA-ORTIZ et al., 2015).

Um dos marcadores utilizados para caracterização genética de linhagens e estudos filogenéticos de *A. marginale* são os genes que codificam as “Proteínas Principais de Superfície” (MSPs), que estão envolvidas nas interações entre hospedeiro e patógeno, e patógeno e carrapato (DE LA FUENTE et al., 2007). *Anaplasma marginale* possui um pequeno genoma circular (estirpe St. Maries EUA), com tamanho estimado de 1.197.687 pares de bases. Dentre as 949 sequências codificantes anotadas neste genoma, 62 foram previstas para expressar proteínas da membrana externa, e destas, 49 pertencentes ao grupo das Proteínas Principais de Superfície 1 (MSP1) e a superfamílias de MSP2 (BRAYTON et al., 2005).

Foram identificadas seis Proteínas de Superfície Principais (MSPs) em *A. marginale* derivados de eritrócitos de bovinos, e foram encontradas conservadas em organismos derivados de carrapatos e culturas de células. Três dessas MSPs, ou seja, MSP1a, MSP4 e MSP5, são codificadas por genes únicos, e não variam antigênicamente dentro de isolados, enquanto MSP1b, MSP2 e MSP3 são de famílias multigênicas e podem variar antígenicamente, principalmente em bovinos persistentemente infectados (CABEZAS-CRUZ et al., 2013). Estas seis proteínas são responsáveis pela produção de anticorpos em animais que foram naturalmente infectados ou vacinados com corpúsculos iniciais de *A. marginale* (TEBELE et al., 1991).

A MSP1 é um heterodímero composto por dois polipeptídeos distintos MSP1a e MSP1b. A MSP1a é codificada por uma cópia de gene simples *msp1α* (ALLRED et al., 1990). Enquanto a região C- terminal da proteína é bastante conservada, a porção N- terminal é altamente variável, composta por um ou mais peptídeos que contém de 23 a 31 aminoácidos, e possuem bastante similaridade entre si denominados “repeats” (PALMER et al., 2000; DE LA FUENTE et al., 2005).

Em decorrência desta variação o gene *msp1a* é utilizado como um marcador genético estável para identificação de isolados geográficos em todo o mundo (DE LA FUENTE et al., 2007; CABEZAS-CRUZ et al., 2013). Além disso MSP1a contém epítomos sensíveis à neutralização de células B e T, necessários para o desenvolvimento de uma resposta imunológica. MSP1a de *A. marginale* tem sido testada como um candidato a antígeno para anaplasose bovina. Foram encontrados epítomos imunodominantes nestas sequências (CABEZAS-CRUZ & DE LA FUENTE 2015).

O gene *msp1a* tem sido conservado em animais individuais durante as fases aguda e crônica da infecção, e antes, durante e após a transmissão por carrapatos (PALMER et al., 2001). Um dos principais estudos de diversidade genética de *A. marginale* foi realizado por De la Fuente et al. (2007), que analisaram 131 cepas de diferentes regiões da América do Norte e Sul, Europa, Ásia, África. Atualmente têm sido caracterizadas geneticamente mais de 235 repetições de MSP1a (DE LA FUENTE et al., 2005, 2007; CABEZAS-CRUZ et al., 2013; CATANESE et al., 2016).

No Brasil, estudos com isolados de *A. marginale* têm demonstrado uma ampla diversidade genética dentro do mesmo rebanho e em algumas regiões geográficas do país (VIDOTTO et al., 2006; DE LA FUENTE et al., 2004; POHL et al., 2013; SILVA et al., 2015; BAËTA et al., 2015; MACHADO et al., 2015 SILVA et al., 2016). Vidotto et al. (2006) encontraram cepas de *A. marginale* do estado do Paraná, Brasil, que demonstraram alta similaridade genética com cepas do México (100%) e Minas Gerais, Brasil (90–97%) pela análise do gene *msp1α*. De acordo com os autores, durante o desenvolvimento do rebanho bovino brasileiro ocorreram

múltiplas introduções de estirpes de diferentes localizações geográficas, os animais foram importados principalmente dos Estados Unidos, Europa e Ásia.

Pohl et al. (2013) baseados na estrutura de repetição em tandem da proteína MSP1a encontraram 14 diferentes cepas em Minas Gerais, sendo a mais frequente no estudo 72-62-61 a estrutura denominada 72 foi encontrada pela primeira vez neste estudo. Além disso, as estirpes  $\tau$ -57- $\beta$ - $\beta$ - $\gamma$  e  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\gamma$  foram associadas a transmissão transplacentária em bezerros infectados no primeiro dia de vida.

Silva et al.(2015) no Rio de Janeiro avaliaram 20 bezerros do nascimento até um ano de idade através de um estudo longitudinal e observaram que os animais eram frequentemente infectados com mais de um genótipo em uma área endêmica para anaplasose, além disso, as cepas 4-63-27,78-24<sup>2</sup>-25-31 e  $\tau$ -10<sup>2</sup>-15 foram associadas a transmissão transplacentária, na mesma região Baêta et al. (2015) descreveu as cepas 162-F-17-F-F e  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\beta$ -F em dois animais. No mesmo estudo foi realizado o isolamento e manutenção em células de carrapatos IDE8. Enquanto Machado et al. (2015), durante surtos de anaplasose, encontraram nove cepas distintas, sendo  $\tau$ -10-15 e  $\alpha$ - $\beta$ <sup>3</sup>- $\Gamma$  as predominantes associadas com a ocorrência da doença aguda e mortalidade de bezerros em São Paulo.

Muitas estirpes de *A. marginale* têm sido identificadas em distintas regiões geográficas, as quais diferem na biologia, características genéticas e transmissão por carrapatos (DE LA FUENTE et al., 2001a, 2005; 2007). O conhecimento da diversidade genética entre as estirpes de *A. marginale* tem importância na epidemiologia, virulência, e possíveis desenvolvimento de vacinas (VIDOTTO et al., 2006).

## **CAPÍTULO I**

# **CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA (TPB) EM BEZERROS DA REGIÃO NOROESTE DE MINAS GERAIS, BRASIL**

## RESUMO

SILVA, Michele Bahia do Vale. **Caracterização do complexo da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) em bezerros da região noroeste de Minas Gerais, Brasil** 2019.21. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a importância da rickettsia *Anaplasma marginale* e dos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* na ocorrência da tristeza parasitária bovina em bezerros leiteiros do noroeste de Minas Gerais. Foram coletadas 300 amostras sanguíneas de bezerros, seguidas por extração de DNA e Nested-PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores que amplificam fragmentos dos genes *sbp-4* (*B. bovis*) e *rap-1a* (*B. bigemina*) e a Semi-Nested para o gene *msp5* (*A. marginale*). Foram confeccionados esfregaços sanguíneos destes animais. A prevalência de *A. marginale* foi 55,66% (167/300), *B. bigemina*. 15,33% (46/300) e *B. bovis* 4,0% (12/300) dos bezerros examinados pelas técnicas de PCR. Formas parasitárias de *A. marginale* e *B. bigemina* foram encontradas em 36,33% e 2,66% dos esfregaços sanguíneos, enquanto *B. bovis* não foi detectado. Houve diferença estatística entre as prevalências de animais infectados nas faixas etárias 1 (10-70 dias) e 2 (>70-300 dias). Um total de 15 animais com sintomas clássicos da doença foram examinados, e as amostras foram confirmadas como uma infecção simples por *A. marginale* através da Nested-PCR. Esses resultados confirmam a anaplasmoze bovina como a principal agente da tristeza parasitária bovina nos bezerros do rebanho estudado.

**Palavras-chaves:** Bezerros, doenças transmitidas por carrapatos, hemoparasitos, Brasil

## ABSTRACT

SILVA, Michele Bahia do Vale. **Characterization of cattle tick fever (CTF) in calves from the northwestern region of Minas Gerais, Brazil** 2019. 21. Thesis (Doctor Science in Veterinary). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The present study aimed to characterize the importance of the rickettsia *Anaplasma marginale* and the protozoan parasites *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in the occurrence of cattle tick fever (CTF) among dairy calves in the northwest of Minas Gerais, Brazil. Blood samples from 300 calves were collected, followed by DNA extraction and nested PCR using oligonucleotide primers to amplify fragments of the *sbp-4* (*B. bovis*) and *rap-1a* (*B. bigemina*) and semi-nested for the *msp5* gene (*A. marginale*). Blood smears were made from these animals. Among the examined calves, the prevalence of *A. marginale* was 55.66% (n=167/300), *B. bigemina* was 15.33% (n=46/300), and *B. bovis* was 4.0% (n=12/300) by PCR techniques. Parasitic forms of *A. marginale* and *B. bigemina* were found in 36,33% and 2,66% of the blood smears while *B. bovis* was not detected. There was a statistical difference between the positivity of infected animals in the age groups 1 (10-70 days) and 2 (>70-300 days) for *A. marginale* and *B. bigemina*. A total of 15 calves with the classic symptoms of disease were examined, and the obtained samples were confirmed as a simple infection by *A. marginale* through semi-nested PCR. These results confirm bovine anaplasmosis as the primary cause of CTF among the calves of dairy cattle within the studied area.

**Keywords:** Calves, Tick Borne Diseases, Hemoparasites, Brazil.

## 1 INTRODUÇÃO

O estado de Minas Gerais destaca-se no cenário nacional como o maior produtor de leite do Brasil. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística o Estado teve em 2017 uma população estimada de 3,4 milhões de vacas ordenhadas e foram produzidos cerca de 8.9 bilhões de litros de leite nesta unidade federativa (BRASIL, 2017). Entretanto, as enfermidades transmitidas por carrapatos são fatores limitantes à criação de bezerros nas propriedades rurais da região (RIBEIRO et al., 1984).

A Tristeza Parasitária Bovina (TPB), é causada por um complexo de doenças frequentes em bovinos no Brasil (GONÇALVES, 2000). Os agentes que causam a manifestação clínica são os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, provocando a Babesiose, e a rickettsia *Anaplasma marginale*, que provoca a Anaplasmose (GUGLIELMONE, 1995; KOCAN et al., 2004). Os agentes causadores da babesiose bovina são transmitidos pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* e a rickettsia causadora da anaplasmose pode ser transmitida biologicamente por carrapatos, mecanicamente por artrópodes hematófagos como moscas e mosquitos ou fômites e via transplacentária (KESSLER, 2001; KOCAN et al., 2004; SILVA et al., 2015). Quando acometido pela TPB, o animal apresenta sinais clínicos como anorexia, pelos arrepiados, taquicardia, taquipnéia, redução dos movimentos ruminais, prostração, redução da lactação, anemia e icterícia. Nos casos de babesiose também ocorre hemoglobínúria e na infecção por *B. bovis*, o animal também poderá apresentar sinais nervosos, como incoordenação motora, andar cambaleante, movimentos de pedalagem e agressividade (ALMEIDA et al., 2006; COSTA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2018).

No Brasil, a maior parte do território é considerado de estabilidade enzoótica (SOUZA et al., 2000; JULIANO et al., 2007; BRITO et al., 2010; BRITO et al., 2013). No entanto áreas como o sertão da paraíba, sertão do Sergipe, e Centro-Sul do Paraná e extremo-sul do Rio Grande do Sul são áreas de instabilidade enzoótica. Nesta condição os animais mais jovens apresentam baixa imunidade contra *Babesia* spp. e *A. marginale*, e ao se infectarem com idade mais avançada podem desenvolver sintomatologia clínica aguda, com altas taxas de mortalidade (OLIVEIRA et al., 1992; ARTILES et al., 1995; MARANA et al., 2009; COSTA et al., 2011).

O esfregaço sanguíneo é um método tradicional e rotineiramente usado para o diagnóstico de hemoparasitas na fase aguda da doença, especialmente quando a parasitemia é média e alta, parasitas são facilmente detectados nos eritrócitos bovinos (BOSE et al., 1995). Em animais com infecção crônica é um método menos sensível uma vez que a parasitemia é baixa. Neste caso, ferramentas moleculares usando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) aumentam a sensibilidade para detecção de hemoparasitas (AL-HOSARY, 2017).

A Reação em cadeia da Polimerase (PCR) tem apresentado alta especificidade e sensibilidade para estudos epidemiológicos dos agentes etiológicos da TPB (MOSQUEDA et al., 2012; GIGLIOTI et al., 2016; ROMERO-SALAS et al., 2016). Baseado nisto, o objetivo do presente estudo é caracterizar a importância da rickettsia *Anaplasma marginale* e dos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* na ocorrência do complexo da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) em bezerros na região Noroeste de Minas Gerais, utilizando para detecção dos agentes técnicas de PCR e esfregaço sanguíneo.



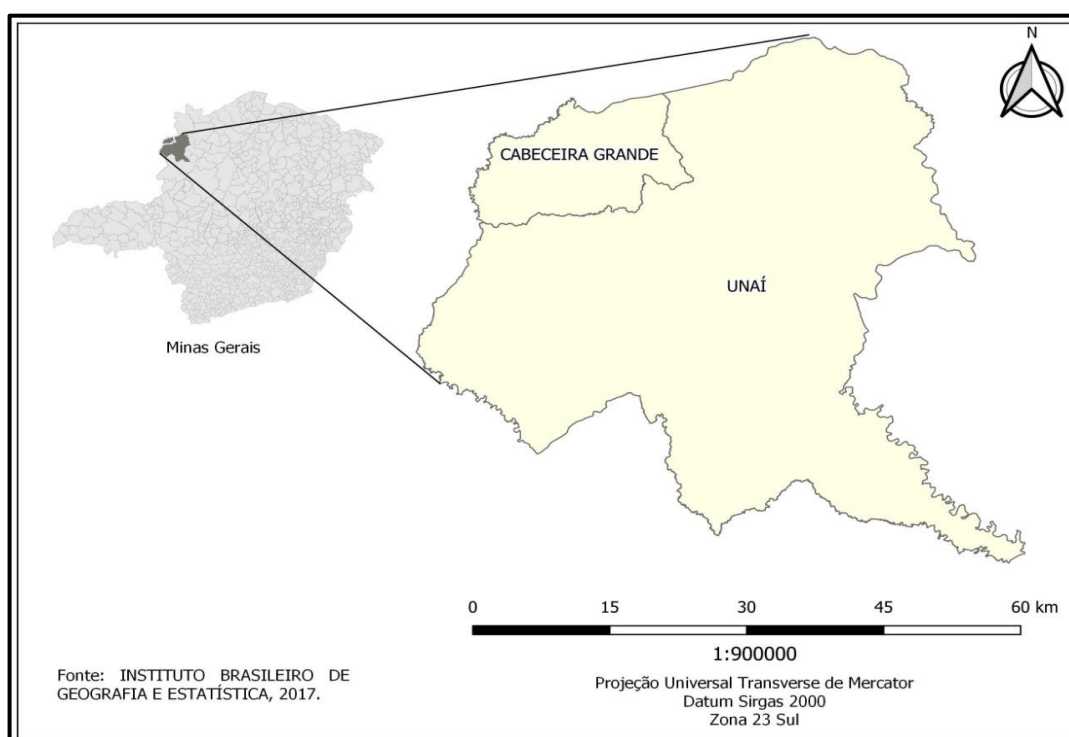
## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Conformidades com as normas éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), sob o protocolo Nº 060/2016 (ANEXO I). A pesquisa encontra-se de acordo com os preceitos e normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

### 2.2 Rebanhos amostrados

Foram selecionados aleatoriamente animais provenientes de quatro propriedades leiteiras localizadas na Região Noroeste do Estado de Minas Gerais, Brasil. As propriedades foram previamente selecionadas tendo como critério o relato dos produtores de ocorrência de casos clínicos de Tristeza Parasitária Bovina nos últimos cinco anos. Assim, selecionou-se três fazendas localizada no município de Unaí e uma propriedade localizada em Cabeceira Grande, Minas Gerais, Brasil (Figura 1). A descrição da localização de cada propriedade (coordenadas), tamanho em hectare, número do rebanho, número de animais avaliados por faixa etária, número de bezerros examinados, raça dos rebanhos avaliados estão descritos na tabela 1.



**Figura 1.** Mapa de Minas Gerais, Brasil. As fazendas do presente estudo estavam localizadas nos municípios de Cabeceira Grande e Unaí, Região noroeste do estado de Minas Gerais.

**Tabela 1.** Descrição das propriedades e bezerros avaliados na região noroeste de Minas Gerais, Brasil.

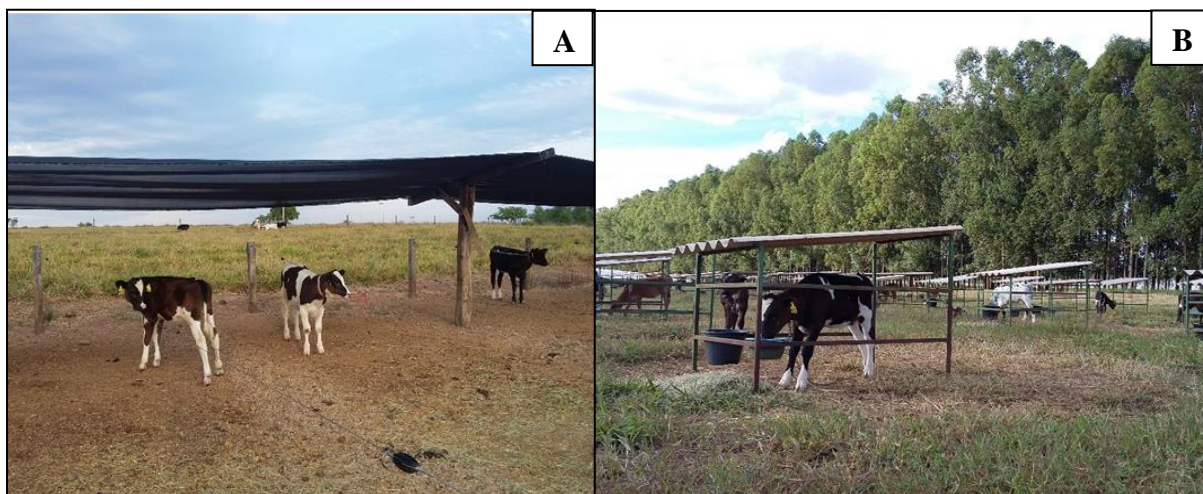
Município	Fazenda (Identificação)	Latitude	Longitude	Tamanho	Nº de animias do Rebanho	Grupo 1 (10-70 dias)	Grupo 2 (>70-300 dias)	Nº Animais examinados	Raças leiteiras
Unai	Fazenda 1	16°06'46.6"S	47°05'49.8"W	240 ha	800	30	70	100	Holandês; Gir; Jersey; cruzamentos
	Fazenda 2	16°19'43.6"S	46°50'51.5"W	200 ha	400	13	20	33	Holandês; Gir; cruzamentos
	Fazenda 3	16°24'45.2"S	47°05'37.5"W	300 ha	350	22	11	33	Holandês; Gir; cruzamentos
Cabeceira Grande	Fazenda 4	16°06'46.6"S	47°05'49.8"W	450 ha	1000	42	92	134	Holandês; Gir; Jersey; cruzamentos

O cálculo do tamanho mínimo da amostra foi determinado pela fórmula,  $N = p \cdot (100 - p) Z^2 / (d \cdot p / 100)^2$  desenvolvida no Centro Panamericano de Zoonoses (1997), N=número de amostras; p=prevalência esperada; Z=grau de confiança; d=margem de erro. A prevalência esperada foi de 50% para os agentes da TPB. O intervalo de confiança foi de 95% e a margem de erro de 5%. Assim, o tamanho amostral constitui no mínimo 196 animais.

### 2.3 Animais

As visitas as propriedades foram realizadas durante o período de janeiro a setembro de 2017 após permissão dos proprietários (Termo de consentimento ANEXO III). Os animais avaliados foram selecionados ao acaso de acordo a disponibilidade da propriedade. Durante a coleta de amostras biológicas uma ficha de coleta foi preenchida com informações sobre as propriedades e os animais (ANEXO IV).

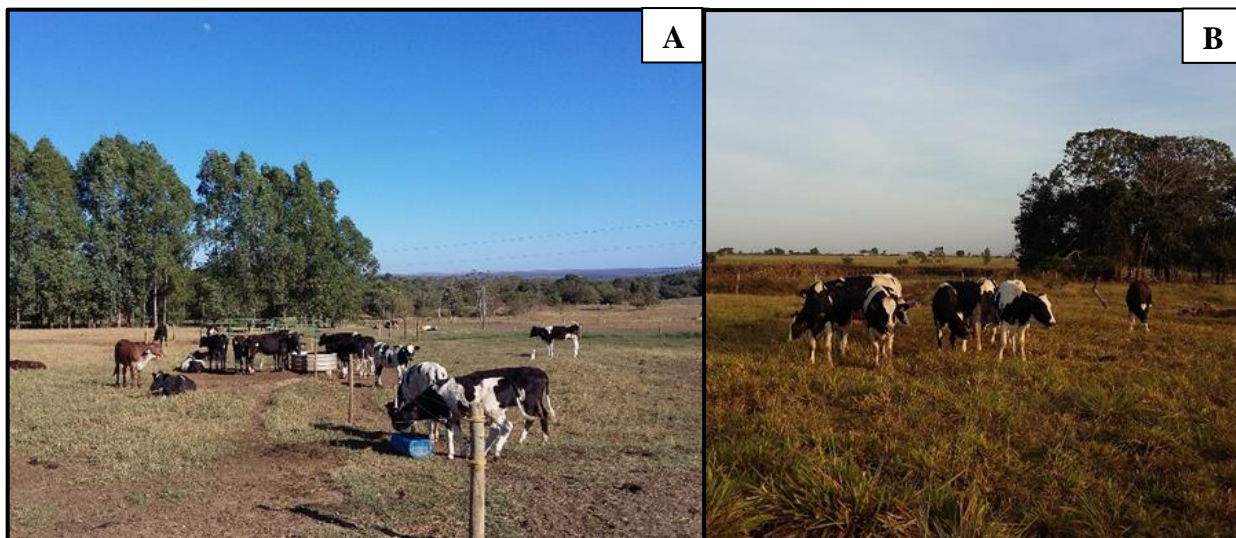
Seguindo o manejo adotado em cada uma das propriedades, todos os animais do grupo 1 (10-70 dias) (Fase de cria) recebiam colostro nos primeiros três dias após o nascimento e o posterior aleitamento foi realizado através de mamadeira e balde individual. Além do leite, todas as bezerras recebiam feno de capim tifton (*Cynodon spp.*) e ração concentrada para bezerras. Nesta fase, o sistema de criação variou entre as propriedades, sendo sistema argentino para as fazendas localizadas em Unaí e sistema de Casinhas individuais para os animais de Cabeceira Grande (Figura 2).



**Figura 2.** Bezerras do grupo 1, fase de cria, em propriedades da região noroeste de Minas Gerais. A) Sistema argentino B) Sistema de casinhas.

O desmame dos animais era realizado em função do peso, ou seja, quando os animais atingiam um peso entre 70 kg e 100 kg, variando com o padrão racial dos animais.

No grupo 2 (> 70-300 dias), fase de recria, os animais eram desmamados e foram mantidos em pasto de *Brachiaria brizantha*, recebendo silagem de milho e ração concentrada para novilhas no cocho. Esses animais apresentaram peso variando de 100 kg a 220 kg, segundo o padrão racial. (Figura 3).



**Figura 3.** Bezerras do grupo 2, fase de recria, em propriedades da região noroeste de Minas gerais. Nesta fase os animais recebiam silagem e ração concentrada no cocho e pastejavam *Brachiaria brizantha* (A e B).

Durante a coleta de amostras biológicas os animais foram inspecionados para presença de ectoparasitas. Os rebanhos eram vacinados contra brucelose, febre aftosa, clostridiose, raiva e Diarréia viral bovina (BVD).

#### **2.4 Colheitas de amostras e esfregaço sanguíneo**

Foram coletadas amostras sanguíneas de 300 bezerros de ambos os sexos do grupo 1 (n= 107) e do grupo 2 (n=193). A coleta foi realizada por meio da punção das veias jugulares ou coccígenas. O sangue total colhido foi mantido em tubo com anticoagulante EDTA (Ethylene-diamine Tetraacetic Acid) para posterior extração de DNA para realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esfregaços sanguíneos foram confeccionados, fixados com metanol, corados com GIEMSA e observados em microscópio óptico (OLYMPUS BX41), na objetiva de 100X, para detecção de *A. marginale* e *Babesia* spp.

#### **2.5 Extração de DNA**

A extração de DNA a partir de sangue total foi realizada utilizando o Kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado, identificado e armazenado em alíquotas de 100 µl em freezer a -20 °C para a posterior realização da PCR.

## 2.6 Detecção molecular de *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina*

O diagnóstico molecular para *A. marginale* foi realizado por meio da técnica de semi-nested PCR para o gene *msp5* padronizada por Torioni De Echaide et al. (1998). Enquanto a nested-PCR para os genes *sbp-4* e *rap-1a* foi realizada para *B. bovis* e *B. bigemina*, respectivamente, ambas de acordo com Terkawi et al. (2011).

As concentrações dos reagentes usados para cada reação encontram no Anexo V enquanto as condições de tempo, temperatura e números de ciclos encontram-se no Anexo VI. Os iniciadores utilizados para os agentes da TPB estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Conjuntos de primers específicos para os genes de *A. marginale* (*msp5*), *B. bovis* (*sbp-4*) e *B. bigemina* (*rap-1a*) utilizando semi-nested PCR (snPCR) e nested-PCR (nPCR)

Gene	Ensaio	Iniciadores	Tamanho do produto
<i>msp5</i>	PCR	5- GCATAGCCTCCGCGTCTT TC- 3 5 –TCCTCGCCTTGGCCCTCAGA- 3	457 pb
	snPCR	5 -TACACGTGCCCTACCGAG TTA- 3 5 –TCCTCGCCTTGGCCCTCAGA- 3	344 pb
<i>sbp-4</i>	PCR	5-AGTTGTTGGAGGAGGCTAAT-3 5 -TCCTTCTCGGCGTCCTTTTC-3	907 pb
	nPCR	5 -GAAATCCCTGTTCCAGAG-3 5 -TCGTTGATAAACTGCAA-3	503 pb
<i>rap-1a</i>	PCR	5-GAGTCTGCCAAATCCTTAC-3 5-TCCTCTACAGCTGCTTCG-3	879 pb
	nPCR	5-AGCTTGCTTTCACAACTCGCC-3 5-TTGGTGCTTTGACCGACGACAT-3	412 pb

PCR: Reação em cadeia da polimerase; snPCR: semi-nested Reação em cadeia da polimerase; nPCR: nested Reação em cadeia da polimerase.

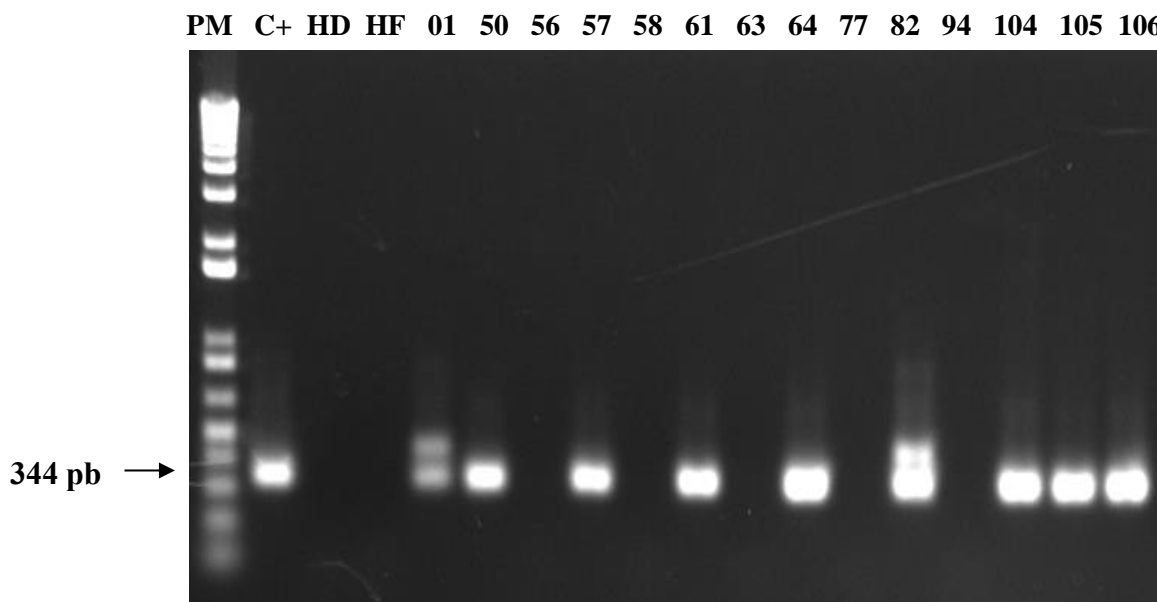
Os produtos das reações da PCR foram analisados por um gel de eletroforese (1,5% agarose). Para cada reação um controle positivo e dois controles negativos (água ultra pura, HyPure™ Molecular Biology). Os controles positivos foram obtidos a partir de sangue de bovinos naturalmente infectados do município de Seropédica, Rio de Janeiro.

## 2.7 Análise Estatística

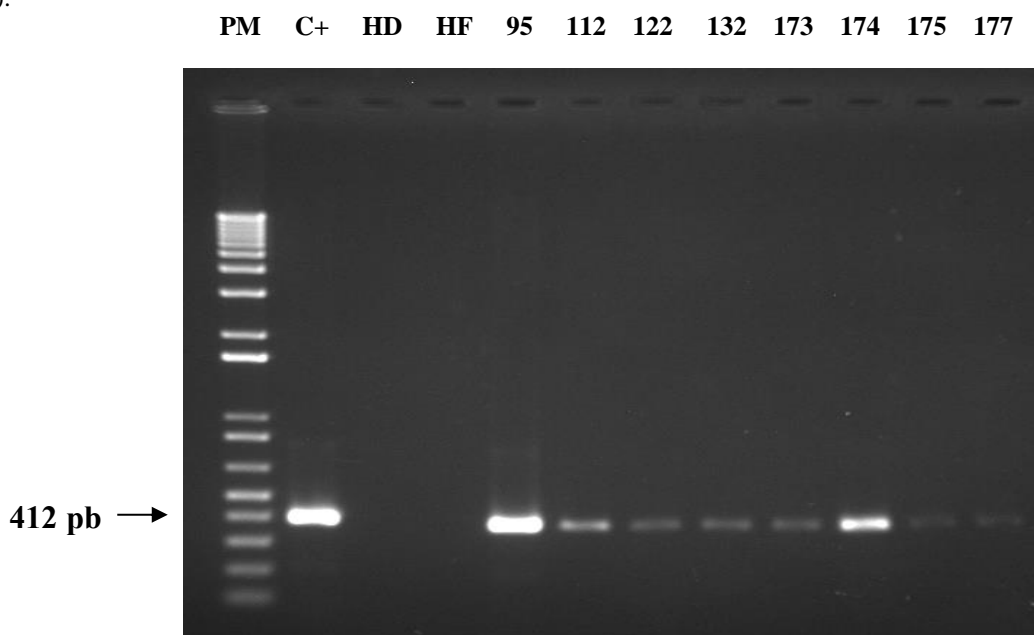
As frequências de animais positivos para *A. marginale*, *B. bovis* e *B. bigemina* entre ou Qui-quadrado, com nível de confiança de 95%. As operações estatísticas foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico R Foundation for Statistical Computing, version 2.12.2 (2011). As frequências de animais positivos para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* entre as fazendas foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95%

### 3 RESULTADOS

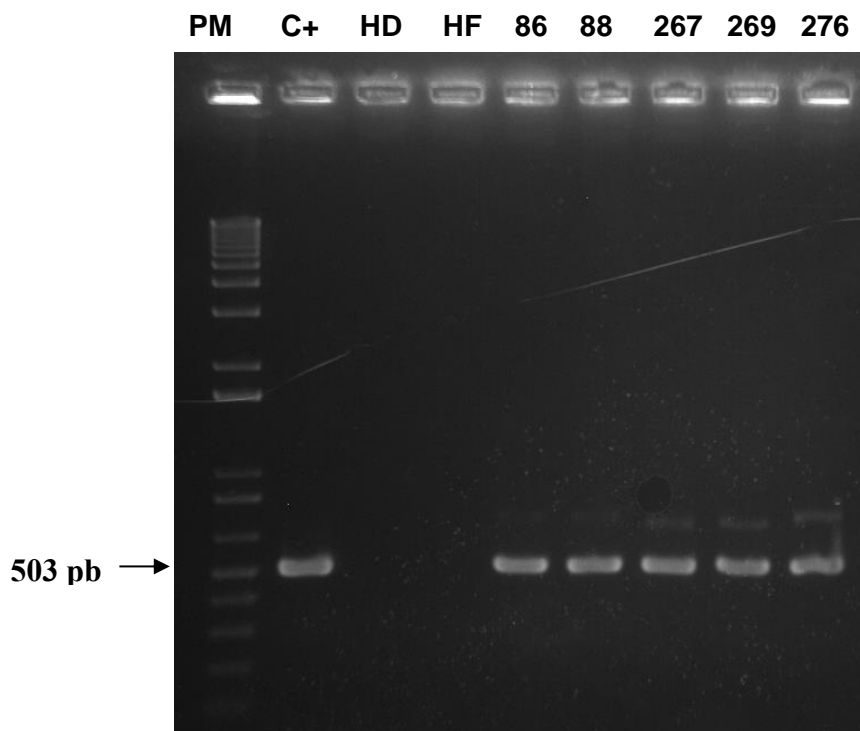
Foi detectada a presença de DNA de *A. marginale* em 55,66% (167/300), *B. bigemina* em 15,33% (46/300) e *B. bovis* em 4,0 % (12/300) dos animais examinados (Figuras 4, 5 e 6). Formas parasitárias de *A. marginale* e *B. bigemina* foram encontradas em 36,33% e 2,66% dos esfregaços sanguíneos (figura 7), enquanto *B. bovis* não foi detectado por meio desta técnica. (Tabela 3).



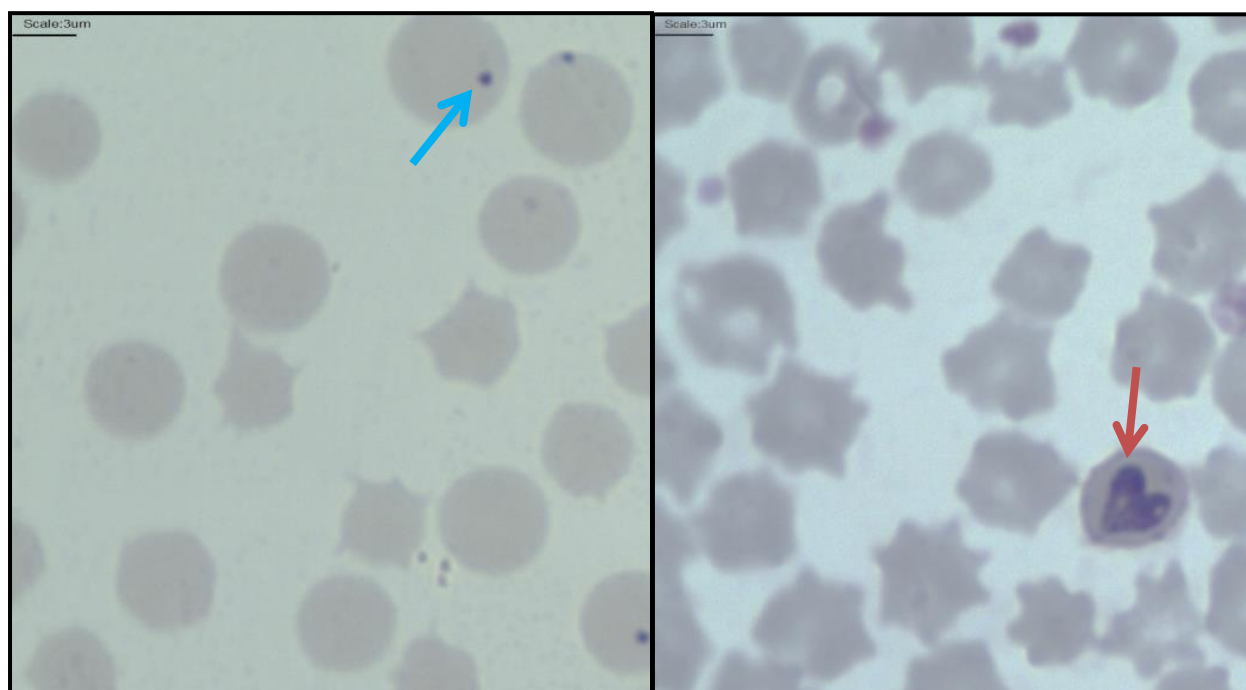
**Figura 4.** Gel de agarose a 1,5 % com os produtos de amplificação da semi-nested PCR para detecção de DNA de *Anaplasma marginale* (gene *msp5*) em amostras de sangue de bezerros. Marcador de peso molecular de 100 pares de base (PM); Controle positivo (C+); Controle negativo (HD e HF); 01 – 106 amostras testes. Amostras positivas (01; 50; 57; 61; 64; 82; 104; 105; 106). Amostras negativas (56; 58; 63; 77; 94).



**Figura 5.** Gel de agarose a 1,5 % com os produtos de amplificação da nested PCR para detecção de DNA de *Babesia bigemina* (gene *rap-1a*) em amostras de sangue de bezerros. Marcador de peso molecular de 100 pares de base (PM); Controle positivo (C+); Controle negativo (HD e HF); 95 – 177 amostras testes positivas.



**Figura 6.** Gel de agarose a 1,5 % com os produtos de amplificação da nested PCR para detecção de DNA de *Babesia bovis* (gene *sbp-4*) em amostras de sangue de bezerros. Marcador de peso molecular de 100 pares de base (PM); Controle positivo (C+); Controle negativo (HD e HF); 86 – 276 amostras testes positivas.



**Figura 7.** Esfregaços sanguíneos de bezerros examinados na região noroeste de Minas Gerais corados com GIEMSA. A) Corpúsculos intraeritrocitários de *A. marginale* (seta azul), escala 3 µm. B) Presença de um par de merozoíto de *B. bigemina* (seta vermelha), escala 3 µm

**Tabela 3.** Frequência de positividade dos agentes da TPB em 300 bezerros da região noroeste de Minas Gerais, Brasil.

Localidade	<i>A. marginale</i>		<i>B. bigemina</i>		<i>B. bovis</i>	
	snPCR	E.S	nPCR	E.S	nPCR	E.S
Cabeceira grande	42,53% (57/134)	28,86% (36/134)	12,68%(17/14)	2,98%(4/134)	4,0%(1/134)	0%(0/134)
Unaí	66,26%(110/16)	43,97% (73/166)	17,46%(29/16)	2,40%(4/166)	6,62%(11/16)	0%(0/166)
Total	55,66%(167/30)	36,33%(109/30)	15,33%(46/30)	2,66%(8/300)	4,0%(12/300)	0%(0/300)

SnPCR: semi-nested Reação em cadeia da polimerase; nPCR: nested Reação em cadeia da polimerase ; E.S: esfregaço sanguíneo.

As frequências dos agentes da TPB em cada fazenda são ilustradas na tabela 4. Não houve diferença estatística entre as propriedades para *A. marginale* (p-value: 0.0521), *B. bigemina* (p-value: 0.6388) e *B. bovis* (p-value: 0.7760).

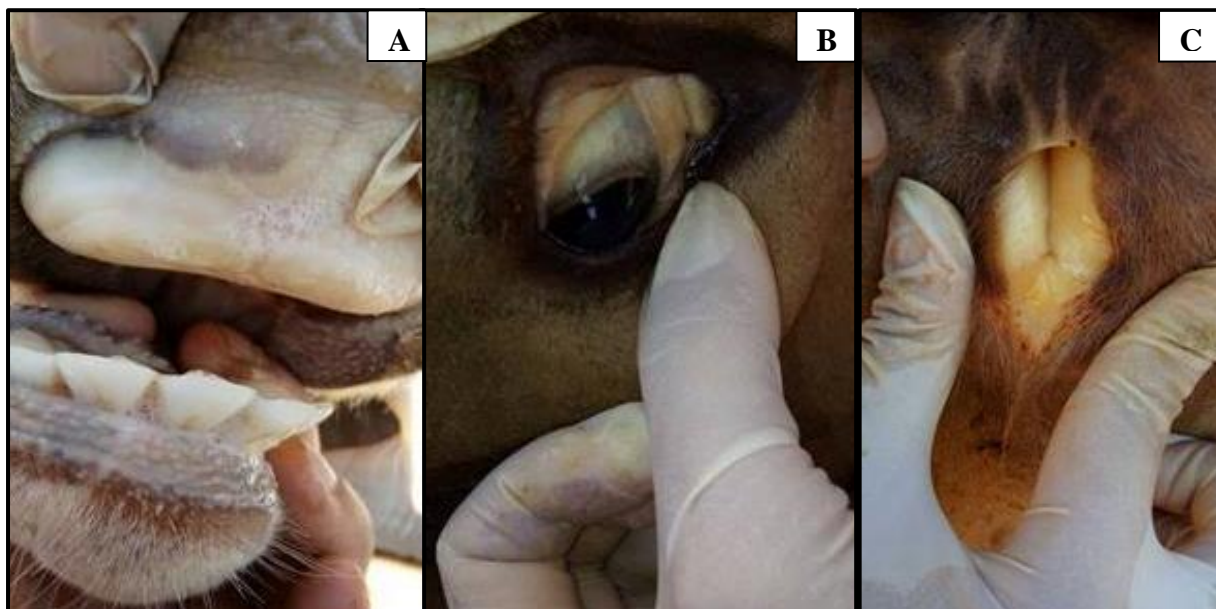
**Tabela 4.** Frequência de positividade dos agentes *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* em bezerros de fazendas leiteiras do noroeste de Minas Gerais, Brasil.

Município	Fazenda	<i>A. marginale</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>B. bovis</i>
Unaí	Fazenda 1	54,00% (54/100)	1,2% (12/100)	6,0% (06/100)
	Fazenda 2	90,90% (30/33)	15,15% (05/33)	6,06% (02/33)
	Fazenda 3	78,78% (26/33)	36,36% (12/33)	9,09% (03/33)
Cabeceira Grande	Fazenda 4	42,53% (57/ 134)	12,68% (17/134)	0,74% (01/134)
<i>p- valor</i>		0,0521	0,6388	0,7740

As taxas de infecções no grupo 1 de bezerros foram de 41,12%, 26,16% e 3,73% para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*, respectivamente. Enquanto no grupo 2 as frequências de positivities foram de 63,73%, 9,32% e 4,14% para os mesmos agentes, respectivamente. Houve diferença estatística para a infecção por *A. marginale* (p-value: 0.0002575) e *B. bigemina* (p-value: 0.0002065), enquanto para *B. bovis* não teve diferença estatística (p-value: 1).

Foram examinados 15 animais com suspeita clínica de TPB no momento das visitas nas propriedades, sendo, posteriormente, confirmada a infecção apenas por *A. marginale*. Dez pertenciam a fazenda 4 de Cabeceira Grande, e outros cinco animais eram da fazenda 1 de Unaí. Os animais enfermos pertenciam ao grupo 2 das propriedades com faixa etária de 70 a 300 dias. Os bezerros com anaplasmose apresentavam principalmente febre, perda de peso, mucosas hipocoradas, ictérica e anemia (Figura 8).





**Figura 8.** Bezerros com sinais clínicos de anaplasmosse. Presença de membrana das mucosas oral e ocular hipocoradas (A e B) e mucosa vaginal ictérica (C).

Durante a inspeção dos animais em cada propriedade foram observadas as presenças de carrapatos e moscas hematófagas (mosca do estábulo, mosca do chifre) e de acordo com os produtores nos períodos de alta pluviosidade também são encontrados tabanídeos nas propriedades.

Os produtores relataram que os animais acometidos pela doença eram comumente tratados com diversos medicamentos, sendo predominante Oxitetraciclina, na concentração de 20 mg/kg, e Dipropionato de imidocarb a 2,1 mg/kg. O controle de carrapatos era realizado principalmente através da aplicação de Ivermectina, 1 mg/kg e por banhos com o produto que atua por contato COLOSSO PULVERIZAÇÃO® (Cipermetrina 15,0 g, Clorpirifós 25,0 g, Citronelal 1,0 g, Ouro Fino, Brasil) e aplicação *pour-on* do produto sistêmico DE FLUAZURON® (Fluazuron 3,00 g e Abamectina 0,50 g, Ouro Fino, Brasil).

## 4 DISCUSSÃO

Maiores taxas de infecção para *A. marginale* em relação a *Babesia* spp. foram observadas no presente estudo. Embora possuam o mesmo vetor biológico *R. microplus*, o uso intensivo de acaricidas, juntamente com medidas de quimioprofilaxia a base de imidocarb, prática utilizada em algumas propriedades da região de estudo, pode estar reduzindo a taxa de transmissão dos protozoários. Além disso, um importante fator epidemiológico para alta prevalência de *A. marginale* é a persistência da infecção no reservatório, consequentemente vetores mecânicos (moscas hematófagas), fômites (material cirúrgico e vacinação com agulhas contaminadas) podem contribuir para o aumento da frequência de *A. marginale* no rebanho (KESSLER, 2001; REINBOLD et al., 2010).

A frequência de animais positivos para os agentes da TPB através da técnica de PCR foi maior do que a técnica de esfregaço sanguíneo. Não foram encontradas formas parasitárias de *B. bovis* no esfregaço sanguíneo. Fahrimal et al. (1992) relata a dificuldade para detectar *B. bovis* em animais portadores devido a baixa concentração de parasitas presente no sangue periférico e preferência por capilares viscerais. De acordo com Böse et al. (1995) a técnica de PCR é 100 vezes mais sensível que o esfregaço sanguíneo, sendo indicada para detecção de animais com baixa parasitemia.

Nossos resultados diferiram de estudos anteriores que obtiveram prevalências de 98,6 e 95,1% para *A. marginale* e *B. bovis* respectivamente, no estado de Rondônia, Amazônia Brasileira (BRITO et al., 2010; BRITO et al., 2013). Assim como diferiu de Souza et al. (2013) na bacia leiteira do Piauí, que encontraram através das análises moleculares prevalências de 76,2%, 52,5%, 33,2% para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis*, respectivamente. Neste estudo os autores sugeriram que a área era de estabilidade enzoótica para a rickettsia e instabilidade enzoótica para *Babesia* spp.. Enquanto Jaimes-Dueñez et al. (2017) através da PCR encontraram taxas de infecção de 59,3%, 31,5% e 13,8 %, respectivamente para *A. marginale*, *B. bigemina* e *B. bovis* em bovinos na Colômbia, sendo estes semelhantes aos nossos resultados. Foi observado que os bezerros do grupo 2 tiveram maior prevalência de infecção para a rickettsia, corroborando com autores que associam o aumento da idade com o aumento da prevalência da TPB (IBRAHIM et al., 2013; SILVA et al., 2015; ABDELA et al., 2018).

A menor prevalência da infecção por *Anaplasma* nos animais mais jovens pode ser atribuída ao pastoreio restrito nos sistemas de cria argentino e casinha (AZEVEDO et al., 2016), que reduzem as chances de contato com os vetores (moscas hematófagas e carrapatos). Além disso, menor prevalência detectada em animais jovens pode ser atribuída à imunidade passiva transmitida durante a ingestão do colostro (ABDELA et al., 2018). Fortalecendo estes resultados, Melo et al. (2001), observaram que mais de 90% dos bezerros apresentam anticorpos anti-*A. marginale* antes do primeiro mês de vida, sendo que, dos três aos cinco meses, estes valores caem até atingirem um mínimo de 13,6% e a partir dos seis meses de idade, por conta da primeira infecção, mais de 96% tornam-se positivos novamente decorrentes da imunidade adquirida.

Nossos resultados corroboram com outros estudos onde a prevalência da doença clínica foi associada principalmente a infecção simples por *A. marginale* (GONÇALVES et al., 2011; AMORIM et al., 2014; COSTA et al., 2011). Em Botucatu, São Paulo, em um estudo retrospectivo dos casos de TPB durante o período de 1987 a 2007 em bezerros mestiços com faixa etária até um ano, *A. marginale* foi o principal agente da doença causando prejuízos econômicos na região (GONÇALVES et al., 2011).

No Nordeste do Brasil Costa et al. (2011) descreveram a ocorrência de 24 surtos no sertão da Paraíba, sendo 75% dos casos associados a infecção simples por *A. marginale*, enquanto

Amorim et al. (2014) na região sul da Bahia detectou *A. marginale* como o principal agente encontrado na TPB.

A maior frequência de casos clínicos por Anaplasmosose pode estar associada também a ampla diversidade genética de *A. marginale*. Estudos relatam diferentes cepas patogênicas envolvidas em surtos da enfermidade no rebanho bovino nas Américas (ALAMZÁN et al., 2008; RUYBAL et al., 2009; MACHADO et al., 2015; SILVA et al., 2015). Nas propriedades leiteiras estudadas, os relatos são de casos clínicos de TPB em animais no grupo 2, fase de recria, com idade variando de 70 a 300 dias. De acordo com Zabel & Augusto (2018) a anaplasmosose clínica é mais comumente encontrada em bovinos com idade superior a um ano. Além disso, vacas no terço final da gestação e/ou lactantes podem apresentar baixa do sistema imune e manifestar sinais de anaplasmosose aguda. A imunossupressão associada ao parto em vacas pode ser a explicação mais plausível para essas observações (AKTAS; ÖZÜBEK, 2017).

Por sua vez, a anaplasmosose superaguda, caracterizada por uma alta taxa de mortalidade dentro de algumas horas de desenvolvimento dos sinais clínicos é mais frequentemente encontrada em raças de origem leiteira (ABBA et al., 2016). Baixas taxas de infecção por *B. bigemina* e *B. bovis* foram observadas em bezerros das fazendas do noroeste de Minas Gerais.

Surtos de babesiose com altas taxas de mortalidade tem sido relacionados a transferência de animais de áreas de instabilidade para zonas de estabilidade enzoótica, onde condições climáticas, manejo das propriedades e uso intensivo de acaricidas interferiram no desenvolvimento do carrapato vetor (SCHILD et al., 2008; ANTONIASSI et al., 2009; HÜE et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2018) Nestes casos a vacinação tem sido um importante método de prevenção para surtos de babesiose (GOHIL et al., 2013).

As propriedades do presente estudo utilizavam medicamentos a base de Oxitetraciclina e Dipropionato de imidocarb, embora ambos medicamentos sejam considerados eficazes no tratamento da anaplasmosose aguda, os animais após recuperação clínica da enfermidade permanecem portadores do agente. Diferentes protocolos feitos com ambos medicamentos não foram eficazes para quimioesterilização de *Anaplasma* (COETZEE et al., 2005; COETZEE et al., 2006; ALBERTON et al., 2015).

## 5 CONCLUSÃO

Os agentes da Tristeza Parasitária Bovina infectam bezerros da Região Noroeste de Minas Gerais, Brasil.

A maior frequência de *A. marginale* foi observada conforme o aumento da idade dos bezerros, os quais apresentaram casos clínicos da doença.

O diagnóstico molecular apresentou maior sensibilidade do que esfregaços sanguíneos na detecção dos agentes que compõem a Tristeza Parasitária Bovina.

O manejo adotado em propriedades do Noroeste de Minas Gerais deve ser baseado no diagnóstico adequado, priorizando a inserção de quimioterápicos efetivos contra agentes patogênicos, prevenindo novos surtos da doença na região.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABBA, Y.; JESSE, F. F. A.; SADIQ, M. A.; IBRAHIM, H. H.; CHUNG, E. L. ; BITRUS, T A. A.; LILA, M. A. M.; HAMBALI, I.U. Clinical management and gross pathological findings of a severe anaplasmosis in a dairy cow. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v 3, p. 195-199, 2016.
- ABDELA, N.; IBRAHIM, N.; BEGNA, F. Prevalence, risk factors and vectors identification of bovine anaplasmosis and babesiosis in and around Jimma town, Southwestern Ethiopia, **Acta tropica**, v. 177, p 9- 18, 2018.
- ALAMZÁN, C.; MEDRANO, C., ORTIZ, M., FUENTE, J. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic área. **Veterinary Parasitology**, v.158,p 103–109, 2008.
- ALBERTON, L.R.; ORLANDINI, C.F.; ZAMPIERI, T.M.; NAKAMURA, A.Y.; GONÇALVES, D.D.; PIAU JÚNIOR, R.; ZANIOLO, M.M.; CARDIM, S.T.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J.L. Eficácia do dipropionato de imidocarb, da enrofloxacina e do cloridrato de oxitetraciclina no tratamento de bovinos naturalmente infectados por *Anaplasma marginale*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, p. 1056-1062, 2015.
- ARTELES, J.; ALVES-BRANCO, F.P.J.; MARTINS, J.R.; CORREA, L.B.; SAPPER, M.F.M. Prevalências de *Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale* no município de Bagé, RS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.4, p.179, 1995.
- AMORIM, L. S.; WENCESLAU, A. A.; CARVALHO, F. S.; CARNEIRO, P. L. S.; ALBUQUERQUE, G. R. Bovine babesiosis and anaplasmosis complex: diagnosis and evaluation of the risk factors from Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 328-336, 2014.
- AKTAS, M.; ÖZÜBEK, S. Outbreak of anaplasmosis associated with novel genetic variants of *Anaplasma marginale* in a dairy cattle. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v 54, p. 20–26, 2017.
- ALMEIDA, M. B.; TORTELLI, F.P.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J.L. M.; SOARES, M.P.; FARIAS, N. A. R., RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 237-242, 2006.
- ANTONIASSI, N.A.B.; CÔRREA , A.M.R.; SANTOS, A.S.; PAVARINI, S.P.; SONNE L.; BANDARRA, P.M.; DRIEMEIER, D. Surto de babesiose cerebral em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 39(3), p. 933-936, 2009.
- AZEVEDO, R. A.; COELHO, S.; TAO, S.; MONTEIRO, A. P. A; BITTAR, C. M. M.; LAGE, C. F. A.; FERREIRA, L. S.; SILVA, J. T. TERRÉ, M CASTELLS, L. **Criação de bezerras leiteiras**. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, nº 81 - junho de 2016

BRASIL, IBGE. **Pesquisa da pecuária municipal, 2017**. Disponível em : < www.IBGE.gov.com> . Acesso em : 03 jan. 2019.

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

BRITO, L.G.; ROCHA, R.B.; BARBIERI, F.D.S.; RIBEIRO, E.S.; VENDRAMI, F.B.; SOUZA, G.C.; GIGLIOTI, R.; REGITANO, L.C.A.; FALCOSKI, T.O.R.S.; TIZIOTO, P.C.; OLIVEIRA, M. *Babesia bovis* infection in cattle in the southwestern Brazilian Amazon. **Ticks and Tick borne diseases**, v.4, p.78-82, 2013.

BÖSE, R., JORGENSEN, W.K., DALGLIESH, R.J. Friedhoff KT, de Vos AJ. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, n.57, p.61-74, 1995.

COETZEE, J.F.; APLEY, M.D.; KOCAN, K.M.; RURANGIRWA, F.R.; VAN DONKERSGOED, J. Comparison of three oxytetracycline regimes for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.61-73, 2005.

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, p.347-360, 2006.

COSTA, V.M.M.; RODRIGUES, A.L.; MEDEIROS, J.M.A.; LABRUNA, M.B.; SIMÕES, S.V.D.; RIET-CORREA, F. Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 239-243, 2011.

DOYLE, R.L.; SCHAFFER DA SILVA, A.; GONZÁLEZ MONTEIRO, S.; MORAIS SANTURIO, J.; LÜHERS GRAÇA, D. Eficácia de medicamentos no controle da infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em ratos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.67-71, 2007.

FAHRIMAL Y., GOFF W.L. & JASMER D.P. Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v.301, p. 1374-1379, 1992.

TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D.P.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; SUAREZ, C.E.; MCELWAIN, T.F.; TORIONI DE ECHAIDE, S.. 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, p.777-782, 1998.

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.

GONÇALVES, R.C.; SILVA, A.A.; LAURENTI FERREIRA D.O.; CHIACCHIO, S.B.; LOPES, R.S.; BORGES A.S.; AMORIM, R.M. Tristeza Parasitária em bovinos na região de Botucatu-SP: estudo retrospectivo de 1986-2007. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 32, n. 1, p. 307-312, 2011.

GOHIL, S.; HERRMANN, S.; GÜNTHER, S.; COOKE, B. M. Bovine babesiosis in the 21st century: Advances in biology and functional genomics. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v. 43, n. 2, p. 125–132, 2013.

GIGLIOTI, R.H.; OLIVEIRA, N.; SANTANA, C.H.; IBELLI, A.M.G.; NÉO, T.A.; BILHASSI, T.B.; RABELO, M.D.; MACHADO, R.Z.; BRITO, L.G.; OLIVEIRA, M.C.S. *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection levels estimated by qPCR in Angus cattle from an endemic area of São Paulo state, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v.7, p.657-662, 2016.

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

HÜE, T.; GRAILLE, M.; MORTELECQUE, A.; DESOUTTER, D.; DELATHIÈRE, J.M.; MARCHAL, C.; TEURLAI, M.; BARRÉ, N. Diagnostic methods used to monitor an outbreak of babesiosis (*Babesia bovis*) in a herd of feral cattle in New Caledonia. *Australian Veterinary Journal*, v, 91, p. 254-8, 2013.

IBRAHIM, H.M., ADJOU MOUMOUNI, P.F., MOHAMMED-GEBA, K., SHEIR, S.K., HASHEM, I.S., CAO, S. Molecular and serological prevalence of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in cattle and water buffalos under small-scale dairy farming in Beheira and Faiyum Provinces, Egypt. *Veterinary Parasitology*, v. 198, p 187-192, 2013.

JAIMES-DUEÑEZ, J.; TRIANA-CHÁVEZ, O.; MEJÍA-JARAMILLO, A. M. Parasitological and molecular surveys reveal high rates of infection with vector-borne pathogens and clinical anemia signs associated with infection in cattle from two important livestock areas in Colombia. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v.8, p. 290-299, 2017.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.21, p177-179, 2001.

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

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

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

MELO, V.S.P.; PASSOS, L.M.F.; FACURY-FILHO, E.J.; SATURNINO, H.M.; RIBEIRO, M.F.B. Natural infection off calves by *Anaplasma marginle* in dairy Herds off the Metalúrgica Region, Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.21, n.4, p.146-150, 2001.

- MOSQUEDA, J.; OLVERA-RAMIREZ, A.; AGUILAR-TIPACAMU, G.J.; CANTO, G. Current advances in detection and treatment of babesiosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 1504–1518, 2012.
- OLIVEIRA, A.A.; PEDREIRA, P.A.S.; ALMEIDA, M.F.R.S. Doenças de bezerros. II. Epidemiologia da anaplasmose no estado de Sergipe. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.44, p.377-386, 1992.
- REINBOLD, J.B.; COETZEE, J.F.; SIRIGIREDDY, K.R.; GANTA, R.R. Detection of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in bovine peripheral blood samples by duplex real-time reverse transcriptase PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, p. 2424–2432, 2010.
- RIBEIRO, M.F.B.; PATARROYO, J.H.; SANTOS, J.L; FARIAS, J.E. Epidemiologia da anaplasmose bovina no estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos aglutinantes e fluorescentes na Zona da Mata. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.36, p.425-432, 1984.
- ROMERO-SALAS, D.; MIRA, A.; MOSQUEDA, J.; GARCÍA-VÁZQUEZ, Z.; HIDALGO-RUIZ, M.; VELA, N. A. O.; LEÓN, A. A. P.; FLORIN-CHRISTENSEN, M; SCHNITTGER, L. Molecular and serological detection of *Babesia bovis*- and *Babesia bigemina* infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. **Veterinary Parasitology**, v.217, p.101-107, 2016.
- RUYBAL, P.; MORETTA, R.; PEREZ, A.; PETRIGH, R.; ZIMMER, P.; ALCARAZ, E.; ECHAIDE, I.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; KOCAN, K.M.; DE LA FUENTE, J.; FARBER, M. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v.162, p. 176-180, 2009.
- SILVA, J.B.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z. Low genetic diversity of *Anaplasma marginale* in calves in an endemic area for bovine anaplasmosis in the state of São Paulo, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, p.20-25, 2015.
- SCHILD, A. L.; RUAS, J.L.; FARIAS, N. A.; GRECCO, F. B.; SOARES, M. P. Aspectos epidemiológicos de um surto de babesiose cerebral em bovinos em zona livre de carrapato. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2646-2649, 2008.
- SOUZA, J.C.P.; SOARES, C.O.; MASSARD, C.L.; SCOFIELD, A.; FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Anaplasma marginale* em bovinos na mesorregião Norte Fluminense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n.3, p. 97-101, 2000.
- SOUZA, F.A.L.; J.F.V. BRAGA; PIRES, L. V.; CARVALHO, C.J.S.; COSTA, E. A; RIBEIRO, M.F.B.; SANTOS, R.L.; SILVA, S.M.S. Babesiose e anaplasmose em bovinos leiteiros no Nordeste do Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, p 31057-1061, 2013.
- TERKAWI, M. A.; HUYEN, N.X.; SHINUO, C.; INPANKAEW, T.; MAKLON, K.; ABOU-LAILA, M.; UENO A.; GOO, Y.K.; YOKOYAMA, N.; JITTAPALAPONG, S.; XUAN, X.; IGARASHI, I. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 201-207, 2011.



JULIANO, R. S.; MACHADO, R. Z.; FIORAVANTI, M. C. S.; ANDRADE, G. M.; JAYME, V. S. Soroepidemiologia da babesiose em rebanho de bovinos da raça curraleiro. **Ciência Rural**, v. 37, p.1387-1392, 2007.

OLIVEIRA, P. A.; ALVES, D. M.; ZAMBONI, R.; SCHEID, H. V.; ALBERTI, T. S.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SCHILD, A. L.; SALLIS, E. S. V. Babesiose cerebral em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, p.832-834, 2018.

ZABEL, T. A. & AGUSTO F. B. Transmission Dynamics of Bovine Anaplasmosis in a Cattle Herd. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v 2018, p. 16, 2018.

## **CAPÍTULO II**

### **DIVERSIDADE GENÉTICA DE *ANAPLASMA MARGINALE* (THEILER, 1910) EM BEZERROS NATURALMENTE INFECTADOS EM PROPRIEDADES LEITEIRAS DA REGIÃO NOROESTE DE MINAS GERAIS, BRASIL**

## RESUMO

SILVA, Michele Bahia do Vale. **Diversidade genética de *Anaplasma marginale* Theiler, 1910 em bezerros naturalmente infectados em propriedades leiteiras da região noroeste de Minas Gerais, Brasil.** 2019. 16 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a relação entre a diversidade genética de *A. marginale* e a ocorrência de surtos de anaplasmose em propriedades leiteiras da região noroeste de Minas Gerais. Foram selecionados 30 bezerros previamente positivos (gene *msp5*) para *A. marginale* com infecção assintomática (n=24) e aguda (n=6) para o estudo da diversidade genética através da semi-nested PCR com alvo no gene *msp1 $\alpha$* . Após o sequenciamento das amostras foi determinado o genótipo e estruturas em tandem repeats. Treze diferentes estirpes foram encontradas  $\alpha$ - $\beta$ -F-F-F (9 animais), 13-27-27(3 animais),  $\tau$ -27-18 (3 animais),  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ -BRA1-31 (3 animais),  $\alpha$ -22-13-18 (3 animais), 80-F-F-F-F (2 animais),  $\alpha$ -22-13-13,  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\Gamma$ , M- $\varphi$ - $\varphi$ - $\varphi$ - $\varphi$ -F, 42-25-25-31, Q-Q-Q-M, B-Q-B-Q-B-M, 16-17-F-F (um animal cada). O genótipo E foi predominante em 93,33% das amostras (28/30), seguidos pelos os genótipos C (3,33%) e G (3,33%). Uma nova estrutura repetida em tandem foi descrita no presente trabalho nomeada BRA 1 (TDSSSAS-GVLSQSGQASTSSQLG). A estirpe  $\alpha\beta$ FFF esteve presente em seis animais com sinais clínicos de anaplasmose aguda e em três animais assintomáticos. Assim, embora 13 estirpes tenham sido observadas nos animais avaliados, apenas a estirpe  $\alpha$ - $\beta$ -F-F-F foi identificada durante a ocorrência de doença aguda e mortalidade, sugerimos que esta estirpe possui importante patogenicidade para bezerros no nordeste de Minas Gerais.

**Palavras chaves:** Anaplasmose, *msp1 $\alpha$* , Estirpes, Rickettsia, genotipagem.

## ABSTRACT

SILVA, Michele Bahia do Vale. **Genetic diversity of *A. marginale* Theiler, 1910 in naturally infected calves in dairy farms in the northwestern region of Minas Gerais, Brazil. 2019.** 16p. Thesis (Doctor's Degree in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The aim of this study was to evaluate the relationship between *A. marginale* genetic diversity and the anaplasmosis outbreaks occurrence in dairy farms in northwestern Minas Gerais. Thirty previously positive calves (*msp5* gene) for *A. marginale* with asymptomatic (n = 24) and acute (n = 6) infection were selected for the study of genetic diversity through semi-nested PCR targeting the *msp1 $\alpha$*  gene. After sequencing of the samples, the genotype and tandem repeats structures were determined. Thirteen different strains were found:  $\alpha$ - $\beta$ -F-F-F (9 animals), 13- 27-27 (3 animals),  $\tau$ -27-18 (3 animals),  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ -195-31 (3 animals),  $\alpha$  -22-13-18 (3 animals), 80- F-F-F-F (2 animals),  $\alpha$ -22-13-13,  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\Gamma$ , M- $\varphi$ - $\varphi$ - $\varphi$ - $\varphi$ -F, 42-25-25-31, Q-Q-Q-M, B-Q-B-Q-B-M, 16-17-F-F (1 animal each). Genotype E was predominant in 93.33% of the samples (28/30), followed by genotypes C (3.33%) and G (3.33%). A new repeated tandem structure was described in the present work named BRA 1 (TDSSSASGVLSQSGQASTSSQLG). The  $\alpha$ - $\beta$ -F-F-F strain was present in all animals with acute anaplasmosis and in three animals asymptomatic. Thus, although 13 strains were observed in the animals evaluated, only the  $\alpha$ - $\beta$ -F-F-F strain was identified during occurrence of acute disease and mortality, we suggest that this strain has important pathogenicity for calves in northeastern Minas Gerais.

**Keywords:** Anaplasmosis, *msp1 $\alpha$* , Strains, Rickettsia, genotyping

## 1 INTRODUÇÃO

Anaplasmosose bovina é uma enfermidade causada pela bactéria intracelular *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae), que possui ampla distribuição em regiões tropicais e subtropicais, causando grandes prejuízos econômicos para pecuária destes países (DUMLER et al., 2001; KOCAN et al., 2004). A enfermidade é mais comumente observada em bovinos, mas outras espécies como búfalos, bisões, antílopes africanos, e algumas espécies de cervos podem ser infectadas (TONETTI et al., 2009; VATSYA et al., 2013; BERGGÖTZ et al., 2014). Bovinos de todas as idades podem ser infectados e permanecem portadores permanentes com sinais clínicos variando de assintomáticos a casos agudos com febre, anemia, abortos, perdas de peso, diminuição na produção de leite ou morte (KESSLER; SCHENK, 1998; RIBEIRO; PASSOS, 2002).

No Brasil o principal vetor de *A. marginale* é o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. A morbidade da anaplasmosose está relacionada principalmente a flutuação da população do vetor (KESSLER, 2000). Além disso, a transmissão mecânica ocorre quando o sangue infectado é transferido para animais suscetíveis por picadas de moscas ou por fômites contaminados, sendo ainda raramente observada a transmissão transplacentária no rebanho (KESSLER, 2000).

Muitas cepas de *A. marginale* têm sido identificadas em distintas regiões geográficas, as quais diferem na biologia, características genéticas e transmissão por carrapatos (DE LA FUENTE et al., 2001a, 2005; 2007). A diversidade genética de *A. marginale* tem sido caracterizada através de genes que codificam Proteínas Principais de Superfície (MSPs), que estão envolvidas nas interações com células dos hospedeiros vertebrados e invertebrados (DE LA FUENTE et al., 2005; 2007).

A proteína MSP1 é um heterodímero composto por dois polipeptídeos distintos, MSP1a e MSP1b. A MSP1a é codificada por uma cópia de gene simples, *mSP1a* (ALLRED et al., 1990) e a análise das sequências repetidas dessa proteína tem identificado diferentes estirpes de *A. marginale* em todo o mundo (DE LA FUENTE et al., 2007; CABEZAS-CRUZ et al., 2013)

No Brasil, estudos com isolados de *A. marginale* têm demonstrado uma ampla diversidade genética dentro do mesmo rebanho e em algumas regiões geográficas do país (DE LA FUENTE et al., 2004; VIDOTTO et al., 2006; POHL et al., 2013; SILVA et al., 2015; MACHADO et al., 2015). No entanto, mais estudos são necessários para compreender quais cepas e genótipos estão relacionados a ocorrência da doença no país. Baseado nisto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a relação entre a diversidade genética de *A. marginale* e a ocorrência de anaplasmosose em propriedades leiteiras da região noroeste de Minas Gerais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Conformidades com as normas éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sob o protocolo CEUA nº 2499120417, (ANEXO II). A pesquisa encontra-se de acordo com os preceitos e normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

### 2.2 Área de estudo e animais

Foram selecionados aleatoriamente animais provenientes de quatro propriedades leiteiras localizadas na Região Noroeste do Estado de Minas Gerais, Brasil. As propriedades foram previamente selecionadas tendo como critério o relato dos produtores a respeito da ocorrência de casos clínicos de Tristeza Parasitária Bovina nos últimos cinco anos. Assim, selecionou-se três fazendas localizada no município de Unaí e uma propriedade localizada em Cabeceira Grande, Minas Gerais, Brasil.

Foram selecionados 30 bezerros com faixa etária entre 10 a 300 dias considerados positivos para o gene *msp5* de *A. marginale* em estudo prévio (Silva, MBV 2019, dados não publicados) entre animais assintomáticos (n= 24) e com anaplasmoose aguda (n= 6). A descrição da localização de cada fazenda, número de animais do rebanho, número de animais examinados estão descritas na tabela 1.

**Tabela 1** - Descrição das características das propriedades e número de bezerros que testaram positivos pelo gene *msp5* para *A. marginale* avaliados na região noroeste de Minas Gerais, Brasil

Município	Fazenda (localização)	Latitude	Longitude	Tamanho propriedade	Nº de animais total	Nº Animais examinados	Raças leiteiras
Unai	Fazenda 1	16°06'46.6"S	47°05'49.8"W	240 hectares	800	6	Holandês; Gir; Jersey; Cruzamentos
	Fazenda 2	16°19'43.6"S	46°50'51.5"W	200 hectares	400	7	Holandês; Gir; Cruzamentos
	Fazenda 3	16°24'45.2"S	47°05'37.5"W	300 hectares	350	4	Holandês; Gir; Cruzamentos
Cabeceira Grande	Fazenda 4	16°06'46.6"S	47°05'49.8"W	450 hectares	1000	13	Holandês; Gir; Jersey; Cruzamentos

### 2.3 Semi-nested PCR para o gene *msp1α*

A Semi-nested PCR foi utilizada para amplificar a sequência do gene *msp1α* de *A. marginale* para estudos da diversidade genética nos animais com anaplasmoose aguda ou infecção assintomática (LEW et al., 2002)

O master mix das reações continha tampão 1X (5x Clolorless Gotaq® Promega), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega®MgCl<sub>2</sub> Solution), 0,2 mM de DNTP'S, 0,2 μM de cada iniciador, 1UI de taq polimerase, DNA e água proporcional para se obter um volume final de 25 μl.

Os iniciadores 1733F (5' TGTGCTTATGGCAGACATTTCC 3') e 3134R (5'TCACGGTCAAACCTTTGCTTACC 3') foram usados na primeira reação, enquanto os iniciadores 1733F (5'TGTGCTTATGGCAGACATTTCC3') e 2957R (5'AAACCTTGTAG-CCCAAC TTATCC 3') foram usados na segunda reação, neste protocolo o produto final de tamanho varia entre 630 a 1190 pares de bases (LEW et al., 2002).

As seguintes condições foram utilizadas para a primeira reação: desnaturação inicial a 94° C por 4 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94° C por 30 segundos, 55° por 1 minuto e 72° C por 2 minutos, e extensão final a 72° C por 7 minutos. Enquanto a segunda reação as condições foram: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 4 minutos, 60° C por 1 minuto e 72° C por 2 minutos, e extensão final a 72° C por 7 minutos.

Os produtos das reações da PCR foram analisados por um gel de eletroforese (1,5% agarose). Para cada reação foi utilizado um controle positivo (Cepa Amrio 2 isolada por BA-ÊTA et al. (2015) e dois controles negativos (água ultrapura) foram incluídos.

### 2.4 Sequenciamento

Os produtos de PCR do gene *msp1α* foram purificados utilizando ExoSAP-IT PCR cleanup reagent (Thermofisher®) e sequenciados utilizando uma plataforma Sanger do tipo capilar no equipamento ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies®).

### 2.5 Análise filogenética

As sequências de nucleotídeos obtidas no sequenciamento e as obtidas em bancos de dados (GenBank®) foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE (EDGAR,2004) no programa Seaview4 (GOUY et al., 2010). As relações filogenéticas foram estimadas usando inferência filogenética por um método de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) implementado em MrBayes v3.2.5 (RONQUIST et al., 2012), sob o modelo de evolução de sequência, Kimura 2-parâmetros + gamma, que foi escolhido depois de testes de modelos alternativos hierarquicamente pela computação usando o critério de informação Bayesiano, determinado no MEGA versão 7 (KUMAR et al., 2016). A análise bayesiana consistiu em duas execuções independentes simultâneas de 3 milhões de gerações MCMC com *burn-in* de 25%.

### 2.6 Análise das estruturas de repetições em tandem e classificação dos genótipos

Um microssatélite foi localizado na 5'UTR do gene *msp1α* entre a sequência Shine-Dalgarno (GTAGG) e o códon de iniciação da tradução (ATG) (DE LA FUENTE et al., 2001). A estrutura do microssatélite foi GTAGG (G/A TTT) m (GT) n T ATG (ESTRADA-PEÑA et al., 2009). A distância SD-ATG foi calculada segundo a fórmula  $(4 \times m) + (2 \times n) + 1$  descrita por Estrada-Peña et al. (2009). Por esta fórmula foi possível obter o número de nucleotídeos e posteriormente classificar as amostras em genótipos.



As sequências de nucleotídeos foram traduzidas para sequências de aminoácidos utilizando o ExPASy translation tool (<http://web.expasy.org/translate>). A análise de sequências repetidas da MSP1a foi realizada segundo a nomenclatura proposta por De la Fuente et al. (2007).

### 3 RESULTADOS

Foram encontradas treze estirpes infectando os bezerros da região noroeste de Minas Gerais:  $\alpha$ - $\beta$ -F-F-F (9 animais), 13-27-27(3 animais),  $\tau$ -27-18 (3 animais),  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ -BRA1-31 (3 animais),  $\alpha$ -22-13-18 (3 animais), 80-F-F-F-F (2 animais),  $\alpha$ -22-13-13,  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\Gamma$ , M- $\phi$ - $\phi$ - $\phi$ - $\phi$ -F, 42-25-25-31, Q-Q-Q-M, B-Q-B-Q-B-M, 16-17-F-F(Um animal cada). O genótipo E foi predominante em 93,33% das amostras (28/30), seguidos pelos genótipos C (3,33%) e G (3,33%).

Dos trinta animais avaliados no momento da coleta seis animais foram encontrados com anaplasmosose aguda, sendo a estirpe  $\alpha$ - $\beta$ -F-F-F associada a surtos da enfermidade na fazenda 4. Os animais enfermos apresentavam sinais clínicos de anaplasmosose como febre, perda de peso, icterícia e anemia. As demais estirpes foram detectadas em animais assintomáticos no momento das visitas nas propriedades.

As sequências repetidas da MSP1a dos animais das fazendas do noroeste de Minas Gerais variaram entre três a seis cópias de repetições em tandem na porção N-terminal da proteína. A diferença produzida da sequência do microsatélite produziu distância SD- ATG entre 19 e 23 nucleotídeos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Isolados de *A. marginale* encontrados em bezerros na região noroeste de Minas Gerais, Brasil.

Fazenda/Animal (Acesso Genbank)	Estrutura de repetições em tandem de <i>msp1<math>\alpha</math></i>	Genótipo	m*	n**	Distância SD-ATG	Fase da doença
<b>Fazenda 1</b>						
Am MG 125 (MT498429)	80-F-F-F-F	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 128 (MT498430)	$\alpha$ -22-13-18	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 129 (MT498431)	$\alpha$ -22-13-13	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 130 (MT498432)	$\alpha$ -22-13-18	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 131 (MT498433)	13-27-27	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 152 (MT498434)	$\alpha$ -22-13-18	E	2	7	23	Assintomática
<b>Fazenda 2</b>						
Am MG 87 (MT498423)	$\tau$ -27-18	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 88 (MT498424)	$\tau$ -27-18	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 90 (MT498425)	$\tau$ -27-18	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 85 (MT498422)	13-27-27	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 96 (MT498428)	13-27-27	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 91 (MT498426)	$\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\Gamma$	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 95 (MT498427)	80-F-F-F-F	E	2	7	23	Assintomática
<b>Fazenda 3</b>						
Am MG 249 (MT498438)	42-25-25-31	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 252 (MT498439)	Q-Q-Q-M	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 253 (MT498440)	B-Q-B-Q-B-M	G	3	5	23	Assintomática
Am MG 254 (MT498441)	16-17- F- F	E	2	7	23	Assintomática
<b>Fazenda 4</b>						
Am MG 36 (MT498413)	$\alpha$ - $\beta$ -F-F-F	E	2	7	23	Aguda
Am MG 44 (MT498414)	$\alpha$ - $\beta$ -F-F-F	E	2	7	23	Aguda
Am MG 53 (MT498416)	$\alpha$ - $\beta$ -F-F-F	E	2	7	23	Aguda
Am MG 69 (MT498418)	$\alpha$ - $\beta$ -F-F-F	E	2	7	23	Aguda
Am MG 71 (MT498419)	$\alpha$ - $\beta$ -F-F-F	E	2	7	23	Aguda
Am MG 81 (MT498421)	$\alpha$ - $\beta$ -F-F-F	E	2	7	23	Aguda
Am MG 50 (MT498415)	$\alpha$ - $\beta$ -F-F-F	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 59 (MT498417)	$\alpha$ - $\beta$ -F-F-F	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 75 (MT498420)	$\alpha$ - $\beta$ -F-F-F	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 27 ( MT498412)	M- $\varphi$ - $\varphi$ - $\varphi$ - $\varphi$ -F	C	2	5	19	Assintomática
Am MG 26 (MT498435)	$\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ -BRA1-31	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 64 (MT498436)	$\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ -BRA1-31	E	2	7	23	Assintomática
Am MG 76 (MT498437)	$\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ -BRA1-31	E	2	7	23	Assintomática

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

n\*\* número de repetições da sequência do nucleotídeo G

Em relação às estruturas da MSP1a, 19 estruturas que compõem repetições em tandem anteriormente descritos ( $\alpha$ ,  $\beta$ , F, M, Q,  $\phi$ , 13, 27,  $\tau$ , 28,  $\Gamma$ , 80, 22, 18, 16, 17, 25, 42, 31) estavam presentes nas estirpes dos bezerros examinados. Uma nova repetição em tandem foi descrita no presente trabalho e nomeada BRA 1 (TDSSSASGVLSQSGQASTSSQLG) em três animais da fazenda 4 (isolados AmMG 26; AmMG 64; AmMG 76), com 23 aminoácidos de comprimento, uma mudança no aminoácido Treonina (posição 1 do peptídeo) foi observada quando comparada à repetição em tandem  $\alpha$  (Figura 1).

Sequencia codificada (Tanden repeat)	
$\alpha$	A D S S S A S G V L S Q S G Q A S T S S Q L G
BRA 1	T *

**Figura 1.** Nova sequencia de MSP1a (nomeada BRA 1) de *A. marginale* encontrada em isolados de bezerros (AmMG 26; AmMG 64; AmMG 76) do Noroeste de Minas Gerais, Brasil.

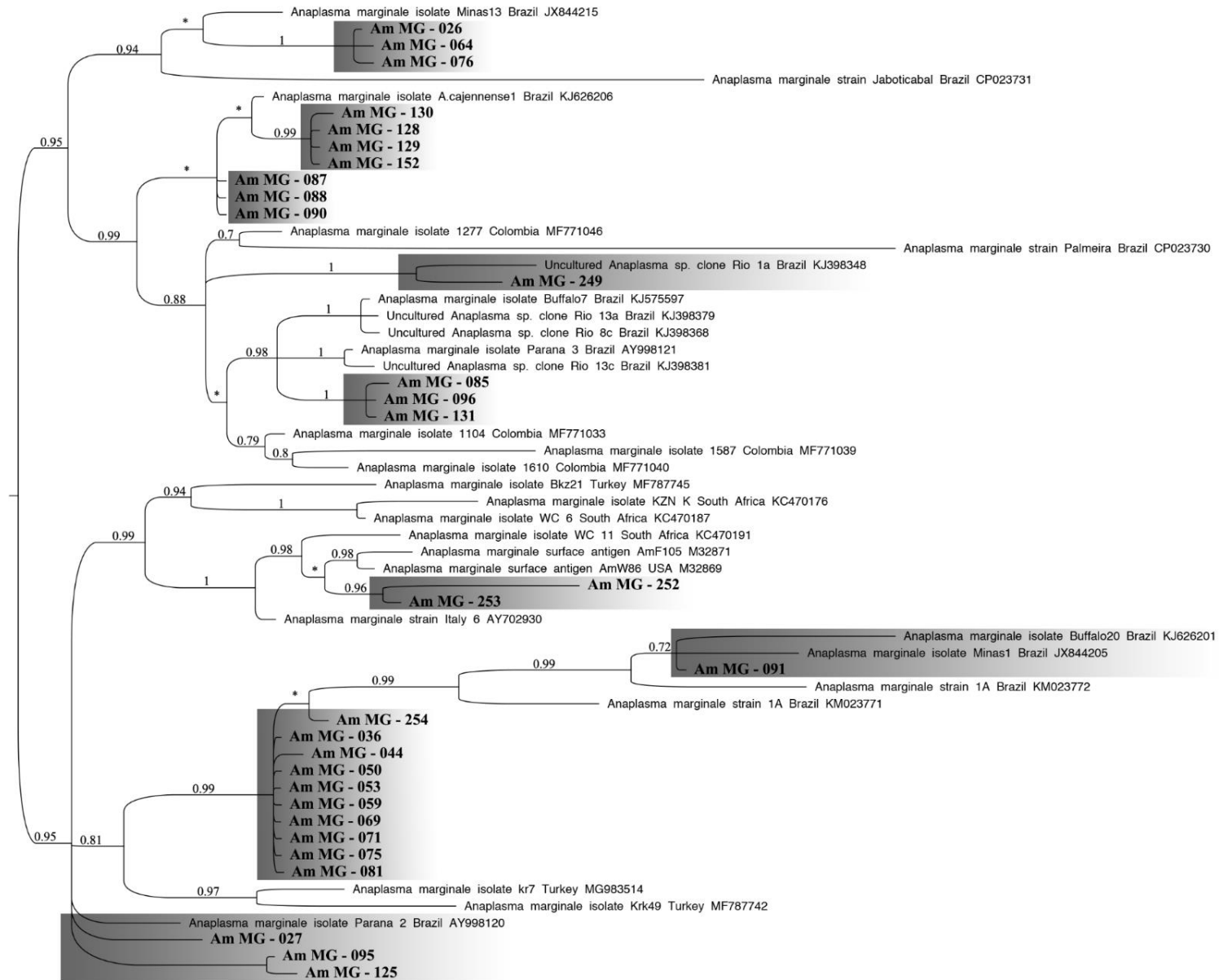
Na fazenda 1 foi observada uma relação evolutiva entre as estirpes  $\alpha$ -22-13-13 e  $\alpha$ -22-13-18. Na tabela 3 podemos observar a diferença na posição do aminoácido 27 entre as estirpes, enquanto  $\alpha$ -22-13-13, havia a presença de leucina, a estirpe  $\alpha$ -22-13-18 apresentava uma serina.

**Tabela 3.** Diferença entre estirpes encontradas em bezerros da Fazenda 1 do noroeste de Minas Gerais, Brasil.

Local	Estirpes	Sequência repetida da MSP1a
		*
Fazenda 1	$\alpha$ -22-13-13 e	TDSSSASGQQQESSVLSQSQASTSSQLG
	$\alpha$ -22-13-18	TDSSSASGQQQESSVLSQSQASTSSQSG

As análises filogenéticas do gene *msp1a* dos isolados encontrados no presente estudo demonstraram alta similaridade com outras sequências obtidas no estado de Minas Gerais (Número de acesso: JX844215; JX844205), Rio de Janeiro (Número de acesso: KJ6262201; KJ3983379; KJ398368; KJ398381), Pará (Número de acesso: KJ575597) e Paraná (Número de acesso: AY998120; AY998121) como ilustra a Figura 2.

**Figura 2.** Árvore filogenética mostrando a relação das estirpes do presente estudo com sequências de *A. marginale* de diferentes localizações geográficas com base nas sequências de *msslα* depositadas no Genbak



## 4 DISCUSSÃO

As estirpes geográficas de *A. marginale* diferem em suas propriedades biológicas e atualmente têm sido caracterizadas geneticamente mais de 250 repetições de MSP1a (DE LA FUENTE et al., 2005, 2007; CABEZAS-CRUZ et al., 2013; CATANESE et al., 2016, Hove et al., 2018).

As análises de microssatélite e repetições em tandem demonstraram uma alta diversidade entre os isolados das propriedades rurais do noroeste de Minas Gerais corroborando com outras regiões do Brasil em que também foram relatadas uma ampla diversidade genética de *A. marginale* em rebanhos bovinos (VIDOTTO et al., 2006; POHL et al., 2013, SILVA et al., 2015; MACHADO et al., 2015; DE SOUZA RAMOS et al., 2019).

Das treze estirpes encontradas no presente estudo, 10 foram descritas pela primeira vez ( $\alpha$ - $\beta$ -F-F-F;  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ -BRA1-31;  $\alpha$ - 22-13-13; 80-F-F-F-F;  $\alpha$ -22-13-18; M- $\phi$ - $\phi$ - $\phi$ - $\phi$ -F; 42-25-25-31; Q-Q-Q-M; B-Q-B-Q-B-M; 16-17-F-F). A alta diversidade genética de *A. marginale* em regiões endêmicas para anaplasmose tem sido associada principalmente a elevada população de carrapatos vetores (ESTRADA-PENÑA et al., 2009). Outra fonte de diversidade genética de *A. marginale* é o comércio de bovinos infectados entre diferentes regiões (LEW et al., 2002). Além disso rebanhos infectados por longos períodos por *A. marginale* mostraram alta diversidade genética (DE LA FUENTE et al., 2007). A estirpe  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\Gamma$  encontrada na fazenda 2 também foi relatada por Pohl et al. (2013) no sul de Minas Gerais em bovinos de um dia de vida. Os autores sugeriram transmissão transplacentária desta estirpe. Em São Paulo, bovinos de propriedades leiteiras foram encontrados infectados com a mesma estirpe com níveis de rickettsemia de  $1.21 \times 10^5$  (MACHADO et al., 2015) enquanto bubalinos infectados apresentaram níveis de parasitemia  $3.23 \times 10^{10}$  no Rio de Janeiro (SILVA et al., 2014). Sugere-se que a estirpe  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\Gamma$  tenha alta capacidade de transmissão nos rebanhos do sudeste brasileiro.

A estirpe 13-27-27 encontrada nas fazendas 1 e 2, também foi descrita por Pohl et al. (2013) em bezerros da região Sul do Estado de Minas Gerais e por Ybañez et al. (2013) em bovinos de Cebu, Filipinas. Enquanto a estirpe  $\tau$ -27-18 encontrada em bovinos leite da fazenda 2 também foi descrita por De Souza Ramos et al. (2019) em bovinos nelores no Mato Grosso do Sul.

Apesar da alta similaridade observada com outras sequências depositadas no GenBank, alguns isolados foram encontrados apenas na região noroeste de Minas Gerais, enquanto outros apresentaram similaridade com isolados da Colômbia e África do Sul. A estirpe  $\alpha$ - $\beta$ -F-F-F associada a casos clínicos agudos de anaplasmose (Isolados Am MG 36; Am MG 44; Am MG 53; Am MG 69; Am MG 71; Am MG 81) formou um “cluster” com outras três isolados de  $\alpha$ - $\beta$ -F-F-F (Isolados Am MG 50; Am MG 59 Am MG 75) associados a animais assintomáticos no momento da coleta.

De acordo com Vidotto et al. (2006), a aquisição de animais de diferentes rebanhos é umas das formas de introdução de diferentes estirpes de *A. marginale* encontradas primariamente em outras regiões geográficas do país, inclusive de outros países.

A ocorrência e a intensidade dos sinais de TPB pode variar de acordo com espécie acometida, virulência da estirpe, inóculo e sensibilidade do hospedeiro. Poucos estudos foram realizados com diversidade genética de *A. marginale* durante surtos de anaplasmose bovina. (PALMER et al., 2001; MACHADO et al., 2015; AKTAS et al., 2017).

No presente estudo, encontramos casos clínicos de anaplasmose bovina na fazenda 4 e, dos 13 bezerros examinados, seis apresentavam sintomas clínicos como emagrecimento, febre, icterícia e mucosas pálidas. Todos os animais doentes apresentaram a estirpe  $\alpha$ - $\beta$ -F-F-F. Sugerimos, portanto, que a estirpe  $\alpha$ - $\beta$ -F-F-F causou a doença em bezerros nas fazendas analisadas

em Minas Gerais, seja uma variante de *A. marginale*, no entanto, mais estudos devem ser realizados para melhor compreender a dinâmica desta infecção.

Estudos anteriores sugeriram que uma única cepa estava associada a surtos da doença (AKTAS e ÖZÜBEK, 2017; PALMER et al., 2001). Nos Estados Unidos, Palmer et al. (2001) encontraram apenas duas cepas patogênicas de *A. marginale* durante um surto de anaplasmose, enquanto outros animais na mesma propriedade que permaneceram persistentemente infectados (assintomáticos), apresentavam alta diversidade.

Silva et al. (2016) encontraram apenas a estirpe  $\alpha$ - $\beta^3$ - $\Gamma$  de *A. marginale*, causando anaplasmose aguda e alta mortalidade em bezerros de rebanho leiteiro em uma fazenda localizada no estado de São Paulo. Aktas e Özübek (2017) detectaram a cepa Tr1 73 associada à doença clínica aguda em vacas em lactação na Turquia, apresentando hipertermia (39-41,5 °C), anemia e perda de peso. Os animais apresentavam mucosas pálidas, icterícia, anorexia, respiração rápida e constipação.

Almazán et al. (2008), no entanto, detectou dez cepas durante surtos de anaplasmose em Tamaulipas, México, sugerindo transmissão biológica estocástica de cepas de *A. marginale* em um rebanho de gado durante surtos de anaplasmose aguda em áreas endêmicas

No presente estudo, a “tandem repeat” BRA1 e  $\alpha$  diferiram apenas em um aminoácido localizado na posição 1. Este resultado também foi observado nas estirpes  $\alpha$ -22-13-13 e  $\alpha$  22-13-18 que diferiram apenas em um aminoácido na posição 29, fornecendo evidências do processo contínuo de diversidade genética de *A. marginale* em bovinos (SILVA et al., 2015).

O genótipo E foi predominante nas fazendas do noroeste de Minas Gerais, apenas duas estirpes M- $\phi$ - $\phi$ - $\phi$ - $\phi$ -F e B-Q-B-Q-B-M, respectivamente, pertenciam aos genótipos C e G. Estes resultados corroboram com Pohl et al. (2013) que observaram que o genótipo E foi predominante em bovinos infectados no sul de Minas Gerais. Estrada-Peña et al. (2009) avaliaram a distribuição de nove diferentes genótipos em quatro ecossistemas distintos em todo o mundo e observaram que o genótipo E é o mais comum na América do Sul, especialmente no Brasil e na Argentina. Entretanto os genótipos B, C, D, G e H têm sido descrito em estudos prévios no Brasil e na Argentina (DE LA FUENTE et al., 2004; VIDOTTO et al., 2006; POHL et al., 2013; MACHADO et al., 2015; SILVA et al., 2015).

No presente trabalho foi predominante SD – ATG de 23 nucleotídeos. O comprimento do microssatélite do gene *msp1a* pode afetar a sua expressão da MSP1a, influenciando a infecção e transmissão de *A. marginale*. Altos níveis de expressão foram relatados para distâncias SD – ATG de 23 a 29 nucleotídeos e baixa expressão para 19 nucleotídeos (Estrada-Peña et al., 2009). Isso sugere alta capacidade de infecção e transmissão das estirpes de *A. marginale* encontradas no noroeste de Minas Gerais.

## 5 CONCLUSÃO

Alta diversidade genética de *A. marginale* foi encontrada em bezerros de fazendas leiteiras no noroeste de Minas Gerais, Brasil, com 10 dez novas cepas sendo descritas ( $\alpha$ - $\beta$ -F-F-F,  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ -BRA1-31,  $\alpha$ -22-13-13, 80-F-F-F-F,  $\alpha$ -22-13-18, M- $\phi$ - $\phi$ - $\phi$ - $\phi$ -F, 42-25-25- 31, Q-Q-Q-M, B-Q-B-Q-B-M, 16-17-F-F) e o genótipo E predominante. A cepa  $\alpha$ - $\beta$ -F-F-F foi identificada em bezerros com doença aguda, incluindo os sinais clínicos de febre, perda de peso, mucosas pálidas e icterícia, sugerimos que esta cepa tem patogenicidade para bezerros no noroeste de Minas Gerais.



## 6 REFERÊNCIAS

ALBERTON, L.R.; ORLANDINI, C.F.; ZAMPIERI, T.M.; NAKAMURA, A.Y.; GONÇALVES, D.D.; PIAU JÚNIOR, R.; ZANIOLO, M.M.; CARDIM, S.T.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J.L. Eficácia do dipropionato de imidocarb, da enrofloxacina e do cloridrato de oxitetraciclina no tratamento de bovinos naturalmente infectados por *Anaplasma marginale*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, p. 1056-1062, 2015.

AKTAS, M.; ÖZÜBEK, S. Outbreak of anaplasmosis associated with novel genetic variants of *Anaplasma marginale* in a dairy cattle. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v 54, p. 20–26, 2017.

BAÊTA, B.A.; RIBEIRO, C.C.D.U.; TEIXEIRA, R.C.; CABEZAS-CRUZ, A.; PASSOS, L.M.F.; ZWEYGARTH, E., **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 141-145, 2015.

BERGGOETZ, M.; SCHMID, M.; STON, D.; WYSS, V.; CHEVILLON, C.; PRETORIUS, A. M.; Gern, L. Tick-borne pathogens in the blood of wild and domestic ungulates in South Africa: Interplay of game and livestock. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.5, p.166 -175, 2014.

BOWIE, M.V.; FUENTE, J. DE LA.; KOCAN, K.M.; BLOUIN, E.F.; BARBET, A. F.. Conservation of major surface protein 1 genes of *Anaplasma marginale* during cyclic transmission between ticks and cattle. **Gene** 9;282(1-2):95-102, 2002.

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

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

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

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

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

DE SOUZA RAMOS, I.A.; HERRERA, H.M.; DE JESUS FERNANDES, S.; Do Amaral, R.B.; de Souza Zanatto, D.C.; Da Silva, T.M.V.; Le Senechal Horta, B., Vilela Campos, J.B.; Almeida Alves, J.V.; de Macedo, G.C.; Machado, R. Z.; André, M. R. Genetic diversity of *Anaplas*

*ma marginale* in beef cattle in the Brazilian Pantanal, **Ticks and Tick-borne Diseases**, (2019), v. 10, p. 805-814, 2019.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Veterinary Microbiology**, v.119, p. 382–390, 2001.

EDGAR RC MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics** 5: 113, 2004.

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

GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, p. 221-224, 2010.

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

KESSLER R.H.; SCHENK M.A.M. Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, p.157. 1998.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.177-179, 2000.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v 33, p.1870-1874, 2016.

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

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

POHL, A.E.; CABEZAS-CRUZ, A.; RIBEIRO, M.F.B.; SILVEIRA, J.A.G.; SILAGHI, C.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. F. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 22, p.129-135, 2013.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET B, LIU L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P.. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.*61: p.539-542, 2012.

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

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

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

TONETTI, N.; BERGGÖTZ, M.; RUTHE, C.; PRETORIUS, A. M.; GERN, L. Ticks and tick-borne pathogens from wildlife in the free state province, South Africa. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, p. 437-446, 2009.

VATSYA, S.; KUMAR, R. R.; SINGH, V.S.; ARUNRAJ, M.R. *Anaplasma marginale* infection in a buffalo: A case report. **Veterinary Research International**, v1, p.51-53, 2013.

RIBEIRO, M.F.B, PASSOS, L.M.F. Tristeza parasitária bovina. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v 39, p.36-52, 2002.

VIDOTTO, M.C.; KANO, S.F.; GREGORI, F.; HEADLEY, S.A.; VIDOTTO O. Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Paraná State, Brazil, using the *msp1-alfa* and *msp4* genes **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 53, p. 404-411, 2006.

YBAÑEZ, A.P.; SIVAKUMAR, T.; YBAÑEZ, R.H.; RATILLA, J.C.; PEREZ, Z.O.; GABOTERO, S.R.; HAKIMI, H.; KAWAZU, S.; MATSUMOTO, K.; YOKOYAMA,

N.; INOKUMA, H. First Molecular Characterization of *Anaplasma marginale* in Cattle and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Ticks in Cebu, Philippines. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.75(1): p. 27-36, 2013.

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, 631-635, 2001.

### 3 CONCLUSÕES GERAIS

Os agentes da Tristeza Parasitária Bovina (TPB) infectam os bezerros da região noroeste de Minas Gerais, sendo mais prevalente *A. marginale*, seguidos por *B. bigemina* e *B. bovis*.

Nos Rebanhos bovinos estudados a anaplasmosose é a principal causa de TPB nos bezerros, sendo observado os casos clínicos conforme o aumento da idade dos animais.

Alta diversidade genética de *A. marginale* foi encontrada em bezerros assintomáticos, no entanto durante surtos de anaplasmosose é observado baixa diversidade genética nos animais enfermos.

A estirpe  $\alpha\beta\text{FFF}$  é associada a anaplasmosose aguda em bezerros da região noroeste de Minas Gerais.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALMEIDA, M.B.D.; TORTELLI, F.P.; RIET-CORREA, B.; FERREIRA, J.L.M.; SOARES, M.P.; FARIAS, N.A.R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 237-242, 2006.

ANTONIASSI, N.A.B.; CÔRREA, A.M.R.; SANTOS, A.S.; PAVARINI, S.P.; SONNE L.; BANDARRA, P.M.; DRIEMEIER, D. Surto de babesiose cerebral em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 39(3), p. 933-936, 2009.

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

BENESI, F.J.; HOWARD, D. L.; SÁ, C. C.; JUNIOR, E. H.B. Relato de um caso de transmissão transplacentária de anaplasmosse bovina. Observações clínico-laboratoriais. **Revista brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, p.175-176,1999.

BRAYTON, K.A.; KAPPMAYER, L.S.; HERNDON, D.R.; DARK, M.J.; TIBBALS, D.L.; PALMER, G.H.; MCGUIRE, T.C.; KNOWLES, D.P. 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 Science USA**, v. 102, n. 3, p. 844-849, 2005.

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

BARROS-BATTESTI, D.M., ARZUA, M.; BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. Butantan, São Paulo, Brasil, 2006.

BERGGÖTZ, M.; SCHMID, M.; STON, D.; WYSS, V.; CHEVILLON, C.; PRETORIUS, A. M.; GERN, L. Tick-borne pathogens in the blood of wild and domestic ungulates in South Africa: Interplay of game and livestock. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.5, p.166 -175, 2014.

BOCK, R. E.; JACKSON, L.; DE VOS, A.; JORGENSEN, W. **Babesiosis of cattle**. Parasitology, v. 129, n. 1, p. S247-S269, 2004.

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

CASTANEDA-ORTIZ, E. J.; UETI, M. W.; CAMACHO-NUEZ, M.; MOSQUEDA, J. J.; MOUSEL, M. R.; JOHNSON, W.C.; PALMER, G. H. Association of *Anaplasma marginale* strain superinfection with infection prevalence within tropical regions, **Plos One**, v.10, p.1-2, 2015.

CAVALCANTE, G. G. **Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecções por Babesia bovis, Babesia bigemina e Anaplasma marginale em bezerros da raça Nelore no Estado de São Paulo. 2007. 123f** Programa de pós-graduação em Medicina veterinária Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, São Paulo.

COSTA, V.M.M.; RODRIGUES, A.L.; MEDEIROS, J.M.A.; LABRUNA, M.B.; SIMÕES, S.V.D.; RIET-CORREA, F. Tristeza parasitária bovina no Sertão da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 239-243, 2011.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Veterinary Microbiology**, v.119,p. 382–390, 2001.

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

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

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

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

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

DÓRIA, R.G.S.; PASSARELLI, D.; CHEQUER, T. N.; REGINATO, G. M.; HAYASAKA, Y. B.; NETO, P. F.; GRIGOLETTO, R.; FREITAS, S. H. Investigação clínica e comparação do esfregaço sanguíneo e PCR para diagnóstico de hemoparasitas em equinos de esporte e tração (carroceiros). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v 36, p. 724-730, 2016.

ELSIFY, A. ; SIVAKUMAR, T.; NAYEL, M.; SALAMA, A.; ELKHTAM, A.; RIZK, M.; MOSAAB, O.; SULTAN, K.; ELSAYED, S.; IGARASHI, I.; YOKOYAMA, N. An epidemiological survey of bovine *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle, buffaloes, and sheep in Egypt. **Parasitology International**, v. 64, p 79–85, 2015.

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, p. 2091-2096, 1993.

FIGUEROA, J.V.; CHIEVES L.P.; JHONSON G.S.; BUENNING G.M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *B. bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**. v.50, p. 69-81, 1993.

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

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.

GOMES, A. O carrapato-do-boi *Boophilus microplus*: ciclo, biologia, epidemiologia, patogenia e controle. In: KESSLER, R.H.; SCHENK, M.A.M. (Eds). **Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1998. Cap.1, p.9-44.

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

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

HODGSON, J.H. Biology and transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. *Annals New York Academy of Sciences*, v. 653, n. 1, p. 42-51, 1992.

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



MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; MARQUES, A. P. C.; CARVALHO, C. M.E.; CUSINATO, F. Q.; CROCCI, A. J.; KESSLER, R. H.; MIGUITA, M. Desenvolvimento de uma prova de imunoabsorção enzimática para detecção de anticorpos contra *Babesia bovis*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 167-170, 2000.

MAHONEY, D.F. The application of epizootiological principles in the control of babesiosis in cattle. **Bull. Off. Int. Epizoot.** v. 81, p. 123-138, 1974.

MOSQUEDA, J.; OLVERA-RAMIREZ, A.; AGUILAR-TIPACAMU, G.; CANTO, G.J. Current advances in detection and treatment of babesiosis. **Current Medicinal Chemistry**, v 9, p.1504-1518, 2012.

NOVAS, J. C. V. Anaplasmosse bovina, Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, coronel Pacheco, Mg, p.23, 1983.

OLIVEIRA, P. A.; ALVES, D. M.; ZAMBONI, R.; SCHEID, H. V.; ALBERTI, T. S.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SCHILD, A. L.; SALLIS, E. S. V. Babesiose cerebral em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, p.832-834, 2018.

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

PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F.R.; MCELWAIN, T.F. Strain composition of the ehrlichia *Anaplasma marginale* within persistently infected cattle, a mammalian reservoir for tick transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, 631-635, 2001.

PALMER, G. H.; KNOWLES, J. R.; RODRIGUEZ, J.L. ; GNAD, D. P. ; HOLLIS, L. C.; MARSTON, T.; BRAYTON, K. A. Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.5381–5384, 2004.

POTGIETER, F.T.; SUTHERLAND, B.; BIGGS, H.C. Attempt to transmit *Anaplasma marginale* with *Hippobosca raptipes* and *Stomoxys calcitrans*. Onderstepoort. **Journal of Veterinary Research**, v. 48, p.119-122, 1981.

POHL, A.E.; CABEZAS-CRUZ, A.; RIBEIRO, M.F.B.; SILVEIRA, J.A.G.; SILAGHI, C.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. F. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 22, p.129-135, 2013.

POHL, A. E. **Epidemiology study of tick-borne diseases in cattle in Minas Gerais, Brazil.2013, 123 f.** Dissertation, LMU München: Faculty of Veterinary Medicine

RIBEIRO, M.F.B.; SALCEDO, J.H.P.; SANTOS, J.L.; FARI, J.E. Inquérito de opinião com criadores da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais: I. Alguns fatores associados com mortalidade de bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.35, p. 547-556, 1983.

SANTOS, L.R.; ARAUJO, F.R; GASPAR, E.B. GULIAS GOMES, C. C .; SACCO, A.M.S; BENAVIDES, M. V .; RAMOS, C.A., n **Protocolo para diagnóstico de babesiose e**

**anaplasmosse.** Em: ANDREOTTI, R. ; Koller, W. W. (Ed.). Carrapatos: protocolos e técnicas para o estudo. Brasília, DF: Embrapa, 2016.

SANTOS, L. R.; GASPAR, E. B.; BENAVIDES, M. V.; TRENTIN, G. Tristeza Parasitária Bovina - Medidas de controle atuais IN: ANDREOTTI, R.; GARCIA, M.V. KOLLER, W. W. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Campo Grande, 242, 2019.

SCHILD, A. L.; RUAS, J.L.; FARIAS, N. A.; GRECCO, F. B.; SOARES, M. P. Aspectos epidemiológicos de um surto de babesiose cerebral em bovinos em zona livre de carrapato. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2646-2649, 2008.

SCOLES, G.A.; BROCE, A.B.; LYSYK, T.J.; PALMER, G.H. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 42, p. 668-675, 2005.

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

SOUZA, F.A.L.; J.F.V. BRAGA; PIRES, L. V.; CARVALHO, C.J.S.; COSTA, E. A; RIBEIRO, M.F.B.; SANTOS, R.L.; SILVA, S.M.S. Babesiose e anaplasmosse em bovinos leiteiros no Nordeste do Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, p 31057-1061, 2013.

SMITH, R.D.; EVANS, D.E.; MARTINS, J.R.; CERESER, V.H.; CORREA, B.L.; PETRACCIA, C.; CARDOZO, H.; SOLARI, M.A.; NARI, A. Babesiosis (*Babesia bovis*) stability in unstable environments. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 510-520, 2000.

RIBEIRO, M.F.B., PASSOS, L.M.F. Tristeza Parasitaria bovina. Cadernos técnicos de veterinária e zootecnia, v. 39, 36-52, 2002.

TAYLOR, M. A. **Parasitologia veterinária**/M. A. Taylor, R. L. Coop, R. L. Wall; tradução José Jurandir Fagliari, Thaís Gomes Rocha. – 4. ed. – Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2017.

TEBELE, N.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H. Induction of protective immunity using *Anaplasma marginale* initial body membranes. **Infect Immun**, v 59, p 3199-3204, 1991.

TONETTI, N.; BERGGÖTZ, M.; RUTHE, C.; PRETORIUS, A. M.; GERN, L. Ticks and tick-borne pathogens from wildlife in the free state province, South Africa. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, p. 437–446, 2009.

TERKAWI, M.A., HUYEN, N.X., SHINUO, C., INPANKAEW, T., MAKLON, K., ABOULAILA, M., UENO, A., GOO, Y.-K., YOKOYAMA, N., JITTAPALAPONG, S. Molecular and

serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. **Veterinary Parasitology**, p. 201-207, 2011.

TORIONI DE ECHAIDE, S., KNOWLES, D.P., MCGUIRE, T.C., PALMER, G.H., SUAREZ, C.E., MCELWAIN, T.F., TORIONI DE ECHAIDE, S. 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, p 777, 1998.

UILENBERG, G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health, **Veterinary Parasitology**, v. 57, p.19- 41, 1995.

UILENBERG, G. *Babesia* – A historical overview. **Veterinary Parasitology**, v. 138, p. 1-2, p. 3-10, 2006.

VATSYA, S.; KUMAR, R. R.; SINGH, V.S.; ARUNRAJ, M.R. *Anaplasma marginale* infection in a buffalo: A case report. **Veterinary Research International**, v1, p.51-53, 2013.

VIDOTTO, M.C.; KANO, S.F.; GREGORI, F.; HEADLEY, S.A.; VIDOTTO O. Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Paraná State, Brazil, using the *msp1*-alfa and *msp4* genes **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**,v. 53, p. 404-411, 2006.

VIEIRA, M.I.B.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.; SACCO, A.M.S.; SILVA, J.G.C. Resposta imune humoral contra *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) em bovinos submetidos a distintas estratégias de controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**,v.11, n.2, p.71-6, 2002.

VEGA, L.E.O.; RODRÍGUEZ, S.D.; ALARCÓN, G.J.C.; FLORES, R.L.; CAMPO, J. O.; ORTIZ, M.A.G.; LA TORRE, J. F.; RAMÍREZ, E.E.R. *Anaplasma marginale* field challenge: protection by an inactivated immunogen that shares partial sequence of *msp1* $\alpha$  variable region with the challenge strain. **Vaccine**, v. 25, p.519– 525, 2007.

KARUNAKARAN, S.; PILLAI, U.N, KURIAKOSE AM, ASWATHY G. *Babesia bigemina* infection in a 20 day old calf. **Journal of Indian Veterinary Association Kerala**, v.9, p. 49–50, 2011.

KESSLER R.H.; SCHENK M.A.M. Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, p.157. 1998.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p.177-179, 2000.

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

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

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

KESSLER, R.H., SCHENK, M.A.M. Carrapato, Tristeza Parasitária e Tripanossomose dos Bovinos. Edition. Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Campo Grande, 157, 1998.

YERUHAM, I.; AVIDAR, Y.; AROCH, I.; HADANI, A. Intra-uterine Infection with *Babesia bovis* in a 2-day-old Calf. **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v.50,p. 60–62, 2003.

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

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

MARTINS, J. C.; CORRÊA, B. L. BABESIOSE E ANAPLASMOSE BOVINA: ASPECTOS DESTAS ENFERMIDADES, **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.1, p.51-58, 1995.

PEREIRA, D. A.A. **Avaliação e otimização de Reações da cadeia em polimerase para diagnóstico molecular e estudo epidemiológico de *Babesia bovis*. 2006, 48 f.** Dissertação (mestrado em parasitologia), Programa de pós graduação em ciência animal, Universidade Federal do Mato grosso do Sul.

PEREIRA, I. B.; NAZARETH, C.; MALCATA, L.; ALVES, H.; FERNÁNDEZ, J. R.; Saraiwa da CUNHA INFECÇÕES PARASITÁRIAS TRANSMITIDAS POR TRANSFUSÃO DE SANGUE Qual o Risco nos Países Não Endêmicos?, **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, p. 897-906, 2011.

YUSUF, J. J. Review on *Bovine Babesiosis* and Its Economical Importance. **Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**, v 4, p. 01-08, 2017

## **ANEXOS**

Anexo I- Declaração de aprovação CEUA - UFVJM

Anexo II- Declaração de aprovação CEUA- UFRRJ

Anexo III- Declaração de consentimento

Anexo IV- Modelo de Ficha de coleta

ANEXO V - Concentrações de reagentes do MasterMIX

ANEXO VI- Condições de tempo, temperatura e número de ciclos para a PCR

## ANEXO I- Declaração de aprovação CEUA UFVJM



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



### CERTIFICADO

Diamantina, 25 de janeiro de 2017.

Certificamos que a proposta intitulada "DETECÇÃO DE BABESIA BOVIS, BABESIA BIGEMINA E ANAPLASMA MARGINALE EM BOVINOS DE LEITE DO MUNICÍPIO DE UNAÍ, MINAS GERAIS, BRASIL", protocolo nº 060/2016, sob a responsabilidade de JENEVALDO BARBOSA DA SILVA - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFVJM) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, em reunião de 25/01/2017.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da proposta	26/01/2017 a 26/01/2018
Espécie/linhagem	<i>Bos taurus</i>
Nº de animais	196 (mínimo) a 400 (máximo)
Peso/Idade	50 a 150 kg/< 1 ano
Sexo	196 ♀
Origem	Fazendas do município de Unai e Cabeceira Grande - MG

*Com o recebimento deste parecer, o responsável compromete-se a entregar o relatório final da proposta até 60 dias após o término. Em caso de planos de aula, a cada seis meses estes deverão ser revalidados.*

*Ressaltamos que, conforme a Resolução Normativa 1, de 9 de Julho de 2010, qualquer alteração no protocolo previamente aprovado, na equipe técnica, bem como acidentes envolvendo os animais, competem ao responsável a comunicação a CEUA/UFVJM.*

Prof. Gustavo Henrique de Frias Castro  
Vice-coordenador CEUA/UFVJM

## ANEXO II- Declaração de aprovação CEUA UFRRJ



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização das estirpes de *Anaplasma marginale* relacionados com casos de mortalidade de bovinos na região noroeste de Minas gerais ", protocolada sob o CEUA nº 2499120417, sob a responsabilidade de **Adivaldo Henrique da Fonseca** e equipe; Michele Bahia do Vale Silva; Jenevaldo Barbosa da Silva; Cláudia Bezerra da Silva - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 24/11/2017.

We certify that the proposal "Characterization of the strains of *Anaplasma marginale* related to cases of bovine mortality in the northwest region of Minas Gerais ", utilizing 200 Bovines (males and females), protocol number CEUA 2499120417, under the responsibility of **Adivaldo Henrique da Fonseca** and team; Michele Bahia do Vale Silva; Jenevaldo Barbosa da Silva; Cláudia Bezerra da Silva - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 11/24/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 01/2018 a 01/2019

Área: [Doenças Parasitárias](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

Idade: [2 a 24 meses](#)

N: [200](#)

Linhagem: [Diversas raças](#)

Peso: [80 a 300 kg](#)

Local do experimento: O local do estudo será em propriedades leiteiras do Noroeste de Minas Gerais, onde se tem registro da infecção natural da anaplasmosse bovina no rebanho.

Seropédica, 28 de novembro de 2017

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

Prof. Dr. Jonimar Pereira Palva  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

### ANEXO III- Declaração de consentimento

#### Declaração de Consentimento

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Assinatura do Responsável (Proprietário):

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Documento de Identidade (quando aplicável):

Número de identificação do(s) animal (is):

Espécie:

Raça:

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de 2017



**ANEXO IV - Modelo de Ficha de coleta**

**FICHA DE COLETA**

**DADOS DA PROPRIEDADE**

Nome da Propriedade: \_\_\_\_\_

Tamanho da propriedade: \_\_\_\_\_ Município: \_\_\_\_\_

Fone: \_\_\_\_\_ Veterinário \_\_\_\_\_

**DADOS DO REBANHO**

Número total de bovinos \_\_\_\_\_ Número de animais examinados \_\_\_\_\_

Raça predominantes \_\_\_\_\_ Principal atividade ( ) Leite ( ) Corte ( ) Misto

**CARRAPATOS**

Presença de carrapatos?

Sim ( ) Não ( )

Faz controle ? ( ) Sim ( ) Não

Tipo de tratamento ( ) Banho ( ) Pour-on ( ) Injetável

Presença de moscas hematófogas?

( ) Nunca. ( ) Somente uma época do ano. Quando? \_\_\_\_\_

( ) Ano todo. Quando a infestação é maior? \_\_\_\_\_

**TPB NO REBANHO**

Histórico de surtos TPB nos últimos cinco anos? ( ) SIM ( ) NÃO

Época dos surtos \_\_\_\_\_ Nº de animais acometidos \_\_\_\_\_

Categoria animal \_\_\_\_\_

Qual tratamento? \_\_\_\_\_ Quantos  
animais morreram?

## ANEXO V – Concentrações dos reagentes do MasterMIX

Quadro 1- Concentrações dos reagentes utilizados para o MasterMIX da reação de *B. bigemina* (*rap-1a*).

Reagentes	PCR	Nested-PCR
Água	Q. S. P *	Q. S. P
Tampão (5X concentrado)	1x	1x
Mgcl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5mM	2,5mM
Dntp ( 2,5 mM)	0, 2 mM	0, 2 mM
Primer F (10 µM)	0,8 µM	0,8 µM
Primer R(10 µM)	0,8 µM	0,8 µM
Taq DNA polimerase (5UI/ µL)	1 UI	1 UI

Q.S.P\*: Quantidade suficiente para

Quadro 2- Concentrações dos reagentes utilizados para o MasterMIX da reação de *B. bovis*. (gene *sbp-4*).

Reagentes	PCR	Nested-PCR
Água	Q. S. P*	Q. S. P*
Tampão (5X concentrado)	1x	1x
Mgcl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5mM	2,5mM
Dntp ( 2,5 mM)	0,2 mM	0,2 mM
Primer R (10 µM)	0,8 µM	0,8 µM
Primer F(10 µM)	0,8 µM	0,8 µM
Taq DNA polimerase 5 UI/ µl	1 UI	1 UI

Q.S.P\*: Quantidade suficiente para

Quadro 3- Concentrações dos reagentes utilizados para o MasterMIX da reação de *A. marginale* (gene *msp5*).

Reagentes	PCR	Semi nested-PCR
Água	Q.S.P*	Q.S.P*
Tampão (5X concentrado)	1X	1X
Mgcl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5mM	1,5mM
Dntp ( 2,5 mM)	0,2 mM	0,2 mM
Primer R (10 µM)	0,2 µM	0,2 µM
Primer F(10 µM)	0,2 µM	0,2 µM
Taq DNA polimerase 5 UI/ µl	1 UI	1 UI

Q.S.P\*: Quantidade suficiente para

## ANEXO VI- Condições de tempo, temperatura e número de ciclos para a PCR

Quadro 1. Condições da reação de *B. bigemina* ( gene *rap-1a*).

Etapa	PCR (Temperatura/tempo)	n PCR (Temperatura/tempo)
Desnaturação inicial	94 ° C - 4:30 minutos	94 ° C - 4:30 minutos
Desnaturação	94° C - 30 segundos	94° C - 30 segundos
Anelamento	55 ° C - 30 segundos	55 ° C - 30 segundos
Extensão	72 ° C- 30 segundos	72 ° C- 30 segundos
Extensão final	72° C- 5 minutos	72° C- 5 minutos
Número de ciclos	34 X	34x

Quadro 2. Condições da reação de *B. bovis* ( gene *sbp-4*).

Etapa	PCR (Temperatura/tempo)	n PCR
Desnaturação inicial	94 ° C - 4:30 minutos	94 ° C - 4:30 minutos
Desnaturação	94° C - 30 segundos	94° C - 30 segundos
Anelamento	55 ° C - 30 segundos	55 ° C - 30 segundos
Extensão	72 ° C- 30 segundos	72 ° C- 30 segundos
Extensão final	72° C- 7 minutos	72° C- 7 minutos
Número de ciclos	34 X	34x

Quadro 3. Condições da reação de *A. marginale* (gene *msp5*).

Etapa	PCR (Temperatura/tempo)	Sn PCR (Temperatura/tempo)
Desnaturação inicial	94 ° C - 5:00 minutos	94 ° C - 5:00 minutos
Desnaturação	94° C - 1:00 minuto	94° C - 1:00 minuto
Anelamento	58 ° C -1:00 minuto	58 ° C -1:00 minuto
Extensão	72 ° C- 1:00 minuto	72 ° C- 1:00 minuto
Extensão final	72° C- 10 minutos	72° C- 10 minutos
Número de ciclos	34 X	34 X