



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Bruno Dall'Agnol

**Caracterização genotípica de cepas brasileiras de *Anaplasma marginale*
(Theiler, 1910)**

Porto Alegre

2015

Bruno Dall'Agnol

**Caracterização genotípica de cepas brasileiras de *Anaplasma marginale*
(Theiler, 1910)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. José Reck Júnior

Porto Alegre

2015

Ficha Catalográfica

D144c Dall Agnol, Bruno

Caracterização genotípica de cepas brasileiras de *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) / Bruno Dall Agnol . – 2015.
88 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira.

Co-orientador: Prof. Dr. José Reck Júnior.

1. Rickettsiales. 2. Anaplasmataceae. 3. SNPs. 4. Sequenciamento de alto rendimento. 5. Genoma. I. Ferreira, Carlos Alexandre Sanchez. II. Reck Júnior, José. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BRUNO DALL'AGNOL

**Caracterização genotípica de cepas brasileiras de *Anaplasma marginale*
(Theiler, 1910)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

- Prof. Dr. Eduardo Eizirik (PUCRS)
- Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado (UNESP)
- Dra. Paula Cristiane Pohl (USP)

Porto Alegre

2015

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...

Façamos da interrupção um novo caminho;

Da queda um passo de dança;

Do medo uma escada;

Do sonho uma ponte;

E da procura...

Um encontro”.

Fernando Sabino

“A verdadeira conquista está na caminhada e não no topo”

Autor desconhecido

“Non progredi est regredi”

Este trabalho é dedicado...
À minha Família (Mário, Cerli, Cleber, Antônia)...
... por vocês, para vocês, sempre!

AGRADECIMENTOS

À DEUS, força maior que guia meu caminho.

Ao professor Dr. José Reck Júnior pelo exemplo pessoal e profissional. Obrigado pela amizade, ensinamentos, por sempre me incentivar a continuar buscando novos conhecimentos e por me ensinar o que é ciência de verdade.

Ao professor Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira por todos os ensinamentos, pela compreensão e amizade e por fazer a diferença na minha formação.

Ao professor Dr. João Ricardo Martins, pelos sábios conselhos e por ter me ensinado grande parte do que sei sobre “Tristeza Parasitária Bovina”.

Ao professor Dr. Guilherme Marcondes Klafke pela amizade e por todo apoio e ajuda no mestrado.

Aos grandes amigos Anelise Webster, DVM, MSc, e Ugo Araújo Souza, DVM, MSc., pela grande ajuda e companheirismo, por me ajudarem a superar os momentos difíceis e aguentarem meus desabaços. Obrigado por serem estas pessoas maravilhosas.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia do IPVDF (Endrigo, Florência, Julsan, Leandro, Luís Henrique, Mateus, Méliani, Rafael, Ramon e Thaís) pela amizade, apoio e por tornarem meu trabalho mais alegre.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia e Microbiologia da PUCRS (Belisa, Bruna Donamore, Bruna Leal, Guilherme, Samara, Shaiana e Stéfani ...), que apesar da pouca

convivência sempre fizeram com que eu me sentisse parte da equipe. Obrigado pela amizade, apoio e troca de experiências.

Aos professores do Laboratório de Imunologia e Microbiologia da PUCRS: Sílvia Dias de Oliveira, Marjo Cado Bessa e Renata Medina da Silva pelo apoio e pelos ensinamentos sobre microbiologia, resistência e persistência à antimicrobianos.

Ao professor Dr. João Carlos Gonzáles pelas importantes lições de vida e interessantíssimas discussões sobre *Anaplasma marginale*.

À professora e amiga Dra. Maria Isabel Botelho Vieira pelos ensinamentos, por ter me apresentado o maravilhoso mundo da Parasitologia ainda na graduação e pelas inúmeras oportunidades que tive como seu orientado na Universidade de Passo Fundo.

Aos pesquisadores e funcionários do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) pelo apoio, em especial à Dra. Laura Lopes de Almeida.

À professora Dra. Fabiana Quoos Mayer pelos conselhos, ajuda no sequenciamento do genoma e importantes sugestões para esta dissertação.

Ao Samuel Cibulski, Biomédico, MSc, pela ajuda no sequenciamento e análise dos genomas.

Às professoras Dra. Sirlei Daffre e Andréa Cristina Fogaça por todos os ensinamentos sobre cultivo celular de *Anaplasma marginale*.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica e Imunologia de Artrópodes do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São

Paulo (Paula, José Mário, Thaís, Sandra, Janaína, Larissa, Maria Fernanda, Gustavo) pela amizade e conhecimento transmitidos e por fazerem eu me sentir parte do laboratório.

À professora Dra. Tatiana Teixeira Torres por todos os ensinamentos sobre genômica e biologia evolutiva e pela importante contribuição à esta dissertação.

Aos integrantes do Laboratório de Genômica e Evolução de Artrópodes do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Gisele, Valéria, Marina, Raquel e Nanci) por me acolherem tão bem no laboratório e por todo o aprendizado e troca de experiências.

Aos professores do PPGBCM da PUCRS que de alguma maneira contribuíram para este trabalho ou fizeram diferença na minha formação.

À Zíngara Leal T. Lubaszewski, secretária do PPGBCM da PUCRS, pela eficiência, ajuda e participação fundamental no dia a dia dos alunos do programa.

À banca do Projeto de Pesquisa (Dra. Fabiana Quoos Mayer, Dra. Angélica Cavalheiro Bertagnolli e Dr. Eduardo Eizirik) pelas importantes sugestões feitas no projeto dessa dissertação.

Aos meus Pais (Cerli e Mário) e ao meu irmão (Cleber) por acreditarem no meu sonho e fazerem de tudo para que ele fosse realizado. Obrigado por todo o apoio e ajuda nessa importante etapa da minha vida.

À minha avó, Antônia, meu exemplo de garra e superação que me ensinou a superar todos os obstáculos da vida sem perder a dignidade.

Aos meus amigos Henrique Eckert, Fábio Zanatta, Bruna Rossato, Fabiane Zanchin,
Anatiele Luersen e Ligiani Mion que mesmo longe sempre me dão força pra continuar.

RESUMO

Anaplasma marginale é um patógeno transmitido por vetores que causa uma doença conhecida como anaplasmose. Até o momento, não há genomas sequenciados de cepas brasileiras disponíveis. O objetivo deste trabalho foi comparar genomas completos de cepas brasileiras de *A. marginale* (Palmeira e Jaboticabal) com genomas de cepas de outras regiões (cepas norte-americanas e australianas). O sequenciamento do genoma foi realizado por sequenciamento de alto rendimento. As *reads* foram mapeadas utilizando o genoma da cepa Florida de *A. marginale* como uma sequência de referência. A identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e inserções/deleções (INDELs) foi realizada. Os dados mostraram diferenças significativas entre as duas cepas brasileiras, e sua comparação com as cepas norte-americanas (Flórida e St. Maries) revelou mais diferenças de nucleotídeos do que com as cepas australianas (Gypsy Plains e Dawn). Esses resultados lançam luz sobre a história evolutiva de *A. marginale* e fornecem a primeira informação genômica de isolados da América do Sul. Avaliar sequências dos genomas de cepas de diferentes regiões é essencial para aumentar o conhecimento do pangenoma desta rickettsia.

Palavras-chave: Rickettsiales, Anaplasmataceae, SNPs, INDELs, Sequenciamento de alto rendimento, genoma.

ABSTRACT

Anaplasma marginale is a vector-borne pathogen that causes a disease known as anaplasmosis. To date, there are no sequenced genomes of Brazilian strains available. The aim of this work was to compare whole genomes of Brazilian strains of *A. marginale* (Palmeira and Jaboticabal) with genomes of strains from other regions (North-American and Australian strains). Genome sequencing was performed by next-generation sequencing. Reads were mapped using the genome of the Florida strain of *A. marginale* as a reference sequence. Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and insertions/deletions (INDELs) was performed. Data showed significant differences between the two Brazilian strains, and their comparison with North-American strains (Florida and St. Maries) revealed more nucleotide differences than with Australian strains (Gypsy Plains and Dawn). These results shed light into the evolutionary history of *A. marginale* and provide the first genome information of South American isolates. Assessing sequences of the genomes of strains from different regions is essential to increase knowledge of the pan-genome of this rickettsia.

Keywords: Rickettsiales, Anaplasmataceae, SNPs, INDELs, Next-Generation sequencing, genome.

LISTA DE ABREVIACÕES

bp – *base pair (pares de base)*

CDs – *Coding DNA sequence (Sequência de DNA codificante)*

cELISA – *Ensaio Imunoenzimático de competição*

DMSO - *Dimethyl sulfoxide (Dimetilsulfóxido)*

DNA – *Ácido desoxirribonucleico*

ELISA – *Ensaio Imunoenzimático*

EUA – *Estados Unidos da América*

FC – *Teste de Fixação do Complemento*

FDA – *Food and Drug Administration*

IM – *Via Intramuscular*

INDELs – *Insertions and Deletions (Inserções e Deleções)*

IPVDF – *Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor*

KDa – *Kilodalton*

MAPA – *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

mg/Kg – *miligrama por kilograma*

MIC – *Minimum Inhibitory Concentration (Concentração Inibitória Mínima)*

MSPs – *Major Surface Proteins (Proteínas de Superfície Principais)*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação Biotecnológica).*

NGS – *Next-generation sequencing (Sequenciamento de próxima geração)*

OIE – *Organização Internacional de Epizootias*

ORF – *Open Reading Frame (Fase de Leitura Aberta)*

pb – *pares de base*

PCR – *Reação em Cadeia da Polimerase*

pg – *parcial genes (genes parciais)*

RIFI – *Reação de Imunofluorescência Indireta*

rRNA – *Ácido Ribonucleico Ribossomal*

RS – *Rio Grande do Sul*

RT-PCR – *Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real*

SNPs – *Single Nucleotide Polimorphism (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)*

TAC – *Teste de Aglutinação em Cartão*

TPB – *Tristeza Parasitária Bovina*

tRNA – *Ácido ribonucleico transportador*

UPGMA – *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean (Método de grupos de pares não ponderados com média aritmética)*

US\$ - *Dólar dos Estados Unidos*

USA – *United States of America (Estados Unidos da América)*

UTR – *Untranslated region (Região não codificante)*

SUMÁRIO

Capítulo 1	17
1.1 Introdução	18
1.1.1 Hospedeiros vertebrados	21
1.1.2 Sinais clínicos	21
1.1.3 Transmissão	22
1.1.4 Ciclo de vida	24
1.1.5 Distribuição geográfica	26
1.1.6 Diagnóstico	28
1.1.7 Tratamento e Profilaxia.....	28
1.1.8 Proteínas de Superfície Principais.....	31
1.1.9 Genomas.....	33
1.1.10 Marcadores Filogenéticos	35
1.2 Justificativa	40
1.3 Objetivos	42
1.3.1 Objetivo Geral.....	42
1.3.2 Objetivos Específicos.....	42
Capítulo 2	43
2.1 Genomic characterization indicates high variability between Brazilian strains of <i>Anaplasma marginale</i>	43
Capítulo 3	45
3.1 Considerações finais	46
Referências Bibliográficas	49

Capítulo 1

Introdução

Justificativa

Objetivos

1.1 Introdução

Anaplasma marginale é uma bactéria intracelular obrigatória da ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae (1) (figura 1), que causa uma enfermidade conhecida como anaplasmoze. Patógenos relacionados na ordem Rickettsiales incluem aqueles que causam doenças emergentes transmitidas por carrapatos, tais como a Anaplasmoze Granulocítica Humana (*Anaplasma phagocytophilum*) e Erliquiose Monocítica Humana (*Ehrlichia chaffeensis*), bem como de doenças estabelecidas, como a Pericardite Africana (*Ehrlichia ruminantium*), a Febre Maculosa do Mediterrâneo (*Rickettsia conorii*) (2), e a Febre Maculosa Brasileira (*Rickettsia rickettsii*) (Figura 2).

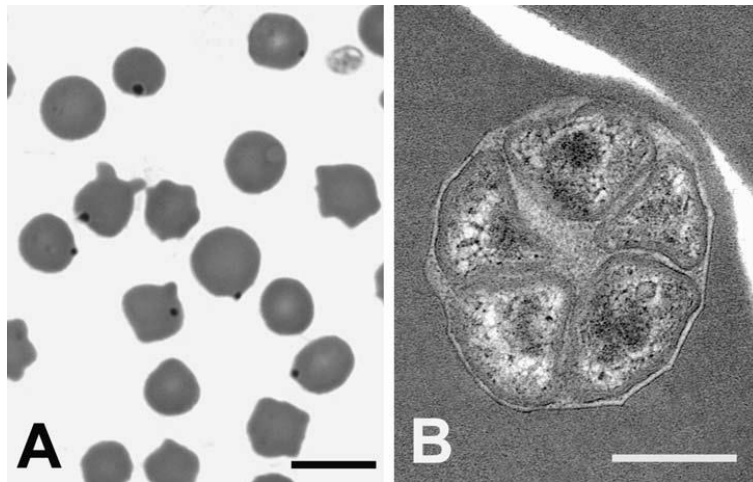


Figura 1: Eritrócitos bovinos infectados com *Anaplasma marginale*. (A) Os corpúsculos de inclusão estão localizados na periferia do eritrócito em uma lâmina de sangue corada. (B) Uma micrografia eletrônica de uma inclusão de *A. marginale* que contém cinco organismos. A, barra = 10 mm; B, barra = 0,5 mm. Fonte: Kocan et al., 2004 (3).

A anaplasmoze é um dos principais entraves à produção de gado em muitos países (1). A anaplasmoze pode causar sérios problemas de saúde para os bovinos, resultando em

perda estimada de US\$ 300 milhões por ano nos Estados Unidos (4). O custo de um caso clínico de anaplasmosose nos Estados Unidos foi estimado em mais de US\$ 400 por animal (5,6). Juntamente com os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, *A. marginale* é responsável por causar um complexo conjunto de sinais nos bovinos conhecido como Tristeza Parasitária Bovina (TPB). No Brasil o carrapato dos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é incriminado como o principal vetor da TPB. Segundo Suarez & Noh (7) estes patógenos em conjunto são responsáveis por causar a doença de maior prevalência e que acarreta os maiores prejuízos no rebanho, considerando as doenças causadas por carrapatos no mundo todo.

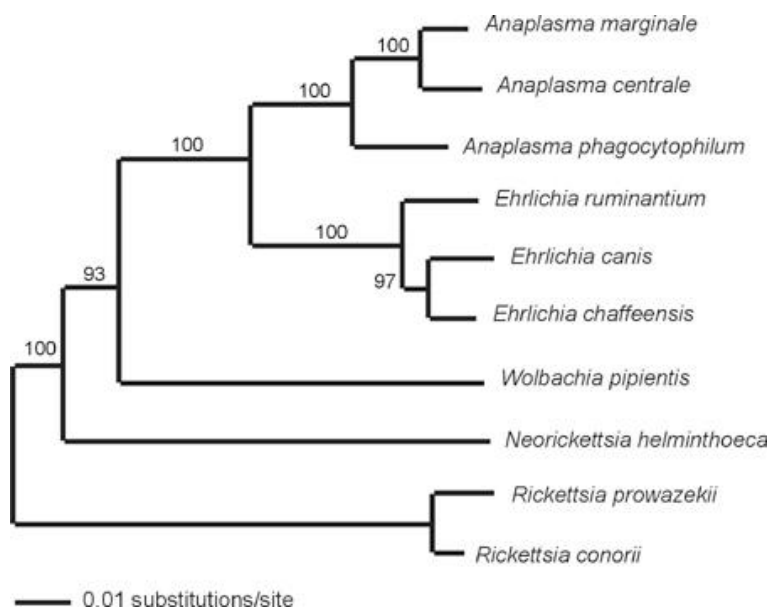


Figura 2: Filograma de membros selecionados da ordem Rickettsiales. Filograma foi construído por PAUP versão 4.0b usando o método de neighbor-joining. São indicados valores de bootstrap para 1000 repetições. Sequências de *16S rRNA* foram utilizados para construir o filograma. Fonte: Brayton et al., 2005 (2).

O complexo TPB, com seus agentes, constitui um dos principais fatores limitantes para o melhoramento da produtividade da bovinocultura em áreas tropicais e subtropicais do

mundo (8). As estimativas existentes apontam grandes perdas, traduzidas por mortalidade, diminuição na produção de carne e leite e custos indiretos com medidas profiláticas e de tratamento dos animais. No Brasil, *R. (B.) microplus* causa perdas econômicas significativas, estimadas em 3,24 bilhões de dólares anuais, de acordo com a atualização realizada por Grisi *et al.* (9), baseada nos dados de Grisi *et al.* (10) e do MAPA (11). Em 1984, os danos causados por *R. (B.) microplus* eram de um bilhão de dólares, sendo cerca de 260 milhões de dólares por prejuízos causados pela TPB (11).

No Rio Grande do Sul a TPB também é responsável por causar grandes prejuízos. Mais da metade (54 %) dos produtores rurais gaúchos indicam o complexo “carrapato/TPB” como a principal e mais comum doença em seus rebanhos. Também, 70% dos seguros de mortes de bovinos no RS são pagos devido a mortes por TPB, que é a principal causa de atendimento clínico veterinário e principal causa infecciosa de mortalidade em bovinos no estado (IPVDF, dados não publicados).

Um trabalho realizado por Vieira & Severo (12) em uma cooperativa do noroeste do estado do Rio Grande do Sul com 2.700 produtores de leite, abrangendo um total de 40.000 animais das raças Holandesa e Jersey, avaliou o impacto econômico da TPB nessa região durante quatro anos (janeiro de 2000 a dezembro de 2003). As perdas estimadas com a ocorrência de 2.714 casos clínicos de TPB nas propriedades estudadas atingiram um montante de US\$ 246.718,24, tendo sido calculados os gastos com atendimentos clínicos, medicamentos e perdas na produção láctea.

As perdas conjuntas por babesiose e anaplasiose em rebanhos leiteiros de regiões infestadas pelo carrapato *R. (B.) microplus* na Argentina foram objeto de estudos de Späth *et al.* (13), os quais diagnosticaram uma incidência clínica anual de 6,5 %. Isso produziu uma

perda de 8 % na produção; 94,4 % destas perdas estiveram relacionadas a perdas físicas (mortalidade, 86,9 %; abortos, 0,2 %; perdas em produção, 0,4 %; retardo na concepção, 4,2 %), enquanto que o custo com o controle ultrapassou 5,6 %.

A anaplasmosose está atualmente classificada na lista B da Organização Internacional de Epizootias (OIE), no Código Sanitário dos Animais Terrestres, devido à sua importância socioeconômica e significância em termos de restrições no comércio internacional de animais e produtos de origem animal (14).

1.1.1 Hospedeiros vertebrados

A anaplasmosose ocorre mais frequentemente em bovinos, mas outros ruminantes, incluindo búfalo de água (*Bubalus bubalis*), bisão americano (*Bison bison*), veados de cauda branca (*Odocoileus virginianus*), veado-mula (*Odocoileus hemionus hemionus*), veado de cauda negra (*Odocoileus hemionus columbianus*), alce das Montanhas Rochosas (*Cervus elaphus nelsoni*) (1,15,16), girafa (*Giraffa camelopardalis*) (17,18), veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) (19), veado-virá (*Mazama gouazoubira*) e cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) podem ser infectados com *A. marginale* (20).

1.1.2 Sinais clínicos

Ristic (21) descreve formas leves, crônicas, agudas e hiperagudas de anaplasmosose, de acordo com a gravidade e duração da enfermidade. Este autor classificou a doença como geralmente leve em terneiros de até um ano de idade; aguda, mas raramente fatal, em bovinos de até dois anos de idade; aguda e, ocasionalmente fatal, até os três anos e, frequentemente, hiperaguda e fatal em bovinos acima de três anos. Os sintomas de anaplasmosose aguda,

geralmente, consistem de anemia, fraqueza, febre, constipação, icterícia, depressão, desidratação, aborto (22) e muitas vezes a morte dos animais (21).

1.1.3 Transmissão

A transmissão de *A. marginale* pode ocorrer por três métodos: transmissão biológica, mecânica ou transplacentária. Na transmissão biológica os eritrócitos infectados são ingeridos por carrapatos e *A. marginale* replica dentro do intestino e glândulas salivares do artrópode vetor e é posteriormente transmitida via saliva do carrapato para ruminantes não infectados. A transmissão mecânica ocorre quando eritrócitos infectados são transferidos sem multiplicação do agente para bovinos susceptíveis, ou seja, sem imunidade prévia, pela picada de insetos hematófagos ou fômites contaminados com sangue, incluindo agulhas e instrumentos cirúrgicos. Na transmissão transplacentária os eritrócitos infectados passam através da placenta no útero de vacas infectadas para os seus descendentes (18).

Cerca de 20 espécies de carrapatos foram incriminadas como vetores em todo o mundo (1,3,23,24). A transmissão por carrapatos pode ocorrer a partir de estádio para estádio (interestadial ou transestadial) ou dentro de um estádio (intraestadial), enquanto que não foi demonstrada a transmissão transovariana de uma geração de carrapatos para outra (25). Conforme revisão feita por Kocan *et al.* (3), a transmissão de *A. marginale* para bovinos por carrapatos foi confirmada nas espécies *R. (B.) annulatus*, *R. (B.) calcaratus*, *R. (B.) decoloratus*, *R. (B.) microplus*, *R. bursa*, *R. evertsi*, *R. sanguineus*, *R. simus*, *Dermacentor albipictus*, *D. andersoni*, *D. hunteri*, *D. occidentalis*, *D. variabilis*, *Hyalomma rufipes*, *Ixodes ricinus*, *I. scapularis* e *Argas persicus*. A transmissão de *A. marginale* por carrapatos de um hospedeiro pode ser explicada devido à mobilidade dos ínstares não adultos e dos machos. O

hábito gregário dos bovinos, com frequentes contatos físicos, principalmente entre mãe e filho e animais em atividade sexual, facilita a passagem dos artrópodos de um bovino para outro (26).

A transmissão mecânica ocorre com frequência via fômites contaminados com sangue, incluindo agulhas, serras de descorna, alicates de nariz, instrumentos de tatuagem, dispositivos de marcação de orelha e instrumentos de castração. A transmissão mecânica foi relatada em dípteros hematófagos do gênero *Tabanus*, *Stomoxys*, e várias espécies de mosquito (1,24,27,28). Recentemente, Scoles *et al.* (29) forneceu evidências de que a cepa Florida de *A. marginale* não seja transmissível por carrapatos, e sua transmissão foi mais eficiente no aparelho bucal das moscas do que a cepa St. Maries, que é transmissível por carrapatos. Esta forma de transmissão mecânica é provavelmente a principal via de disseminação de *A. marginale* em certas áreas dos Estados Unidos, América Central, América do Sul e África, onde carrapatos vetores estão ausentes (1,24,27) e onde *R. (B.) microplus*, o carrapato dos bovinos tropicais, parece não ser um vetor biológico competente do agente (1,30,31).

A transmissão vertical da cepa Virginia de *A. marginale* foi demonstrada experimentalmente em uma de duas vacas expostas durante o segundo ou terceiro trimestre de gestação, mas não durante o primeiro (18,32). Em um estudo na África do Sul, uma incidência de 15,6% na transmissão *in utero* de *A. centrale* ou *A. marginale* foi relatada entre 77 terneiros nascidos de vacas esplenectomizadas e intactas (que não sofreram esplenectomia), cronicamente infectadas ou submetidas a reações primárias durante o primeiro, segundo ou terceiro trimestre de gestação (18,33). A transmissão transplacentária também foi verificada em 32 de 37 terneiros nascidos de vacas que foram afetadas com

anaplasmosse clínica, confirmada em laboratório, nos últimos dois meses de gestação. Todas as vacas recuperaram-se após um tratamento durante cinco dias com 22 mg/kg de tetraciclina (18,34). No Brasil, um estudo realizado com 30 vacas soropositivas para *A. marginale* por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) demonstrou que 63,3% delas eram positivas para o agente pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e que 6,7% dos seus terneiros eram portadores do agente, representando taxa de transmissão transplacentária de 10,5% (35).

1.1.4 Ciclo de vida

Eritrócitos são o único local conhecido de infecção de *A. marginale* em bovinos. Dentro de eritrócitos de bovinos formam-se inclusões ligadas à membrana (também chamados corpúsculos iniciais) que contém entre quatro a oito rickettsias, sendo que 70% ou mais dos eritrócitos podem ser parasitados durante a infecção aguda (1,21,36). O período de incubação da infecção (período pré-patente) varia de acordo com a dose infecciosa entre 7 a 60 dias, com uma média de 28 dias (1). Após o início da parasitemia, o número de eritrócitos parasitados aumenta geometricamente. Eritrócitos infectados são posteriormente fagocitados por células do sistema reticuloendotelial dos bovinos, resultando no desenvolvimento de anemia leve a grave e icterícia sem hemoglobinemia e hemoglobinúria. Os bovinos que sobrevivem à infecção aguda desenvolvem infecções persistentes caracterizadas por baixo nível de parasitemia cíclica (1,37–39).

O ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* em carrapatos é complexo e coordenado com o ciclo de alimentação do carrapato (1,40–42). Eritrócitos infectados ingeridos pelos carrapatos com a refeição de sangue fornecem a fonte de infecção por *A. marginale* para as

células do intestino de carrapatos. Após o desenvolvimento do patógeno nas células do intestino, muitos outros tecidos do carrapato são infectados, inclusive as glândulas salivares, local a partir do qual *A. marginale* é transmitido para os bovinos durante a alimentação (1,3,40,43). Em cada local de infecção em carrapatos, *A. marginale* se desenvolve dentro de vacúolos ligados à membrana, também chamados de colônias (3). A primeira forma de *A. marginale* vista dentro da colônia é a forma reticulada (vegetativa), que se divide por fissão binária, formando grandes colônias que podem conter 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 (1). Um esquema do ciclo de vida de *A. marginale* em bovinos e carrapatos está representado na figura 3.

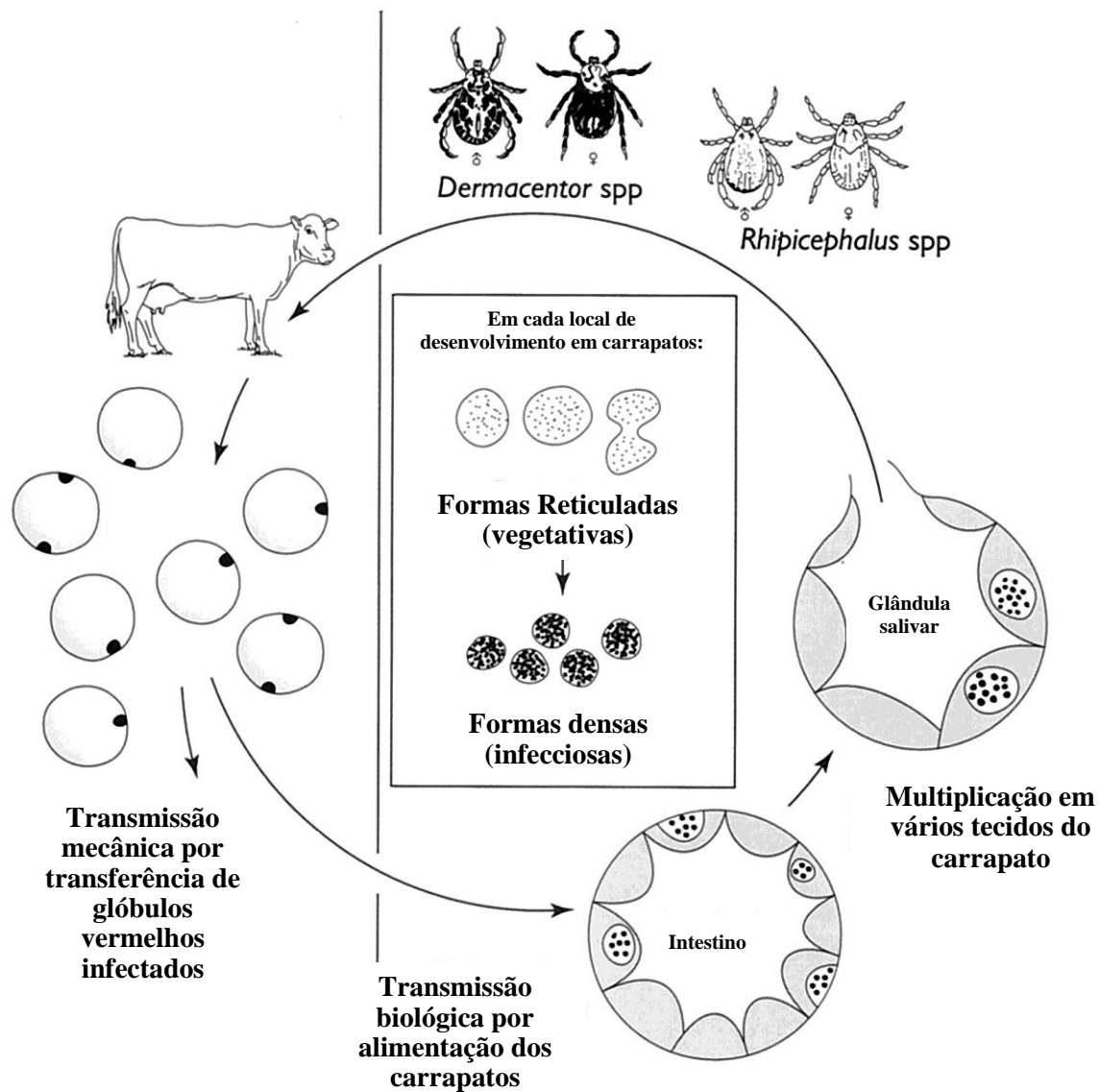


Figura 3: Esquema do ciclo de desenvolvimento de *A. marginale* em bovinos e carrapatos. Fonte: Modificado de Kocan et al., 2003 (4).

1.1.5 Distribuição geográfica

A anaplasmoze bovina ocorre em áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo. A anaplasmoze é enzoótica em todos os países latino-americanos, com exceção de áreas desérticas e algumas cadeias de montanhas, como os Andes (44). Nos EUA, a anaplasmoze

é enzoótica em todos os estados do sul do Atlântico, da Costa do Golfo, e vários do Centro-Oeste e estados ocidentais (45). No entanto, a anaplasmosose tem sido relatada em quase todos os estados dos EUA. As taxas de soroprevalência de *A. marginale* variam amplamente entre os países das Américas e a variabilidade dessas taxas contribui para o desenvolvimento das regiões geográficas de estabilidade enzoótica, uma condição que implica uma alta incidência do organismo em bovinos, mas raramente a ocorrência de doença clínica (46). Na Europa, *A. marginale* é encontrada principalmente nos países do mediterrâneo, onde infecções foram descritas em bovinos e espécies selvagens variadas (47). A anaplasmosose bovina também é endêmica em regiões da Ásia e da África. Alguns autores afirmam que a distribuição da anaplasmosose pode alterar-se em parte como resultado de um potencial aquecimento global, em decorrência do movimento dos carrapatos hospedeiros (48).

O conceito de "estabilidade enzoótica", onde a taxa de transmissão é suficiente para imunizar a maioria dos terneiros sensíveis antes da perda da imunidade materna, tem sido um conceito epidemiológico aceito por décadas. O nível de imunidade do rebanho é geralmente medido por técnicas sorológicas (nível de anticorpos) e expressa em termos de taxa de inoculação, que é a probabilidade que qualquer animal do rebanho irá contrair a infecção. A uma taxa de inoculação de 0,005, o mínimo necessário para a manutenção da estabilidade enzoótica, pelo menos 75% do rebanho deve ter sido infectado com a idade de nove meses. Taxas de inoculação entre 0,0002 e 0,005 estão associadas com alta incidência de infecções primárias entre bovinos mais suscetíveis (mais de nove meses de idade), caracterizando instabilidade enzoótica (49). Na medida em que a taxa de transmissão depende inteiramente da população de vetores, a instabilidade enzoótica pode ocorrer quando essa população

diminuir devido a fatores climáticos ou de gestão, tais como tratamento para diminuir as populações dos vetores (49).

1.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da anaplasmoze bovina pode ser feito pela visualização de *A. marginale* em esfregaços de sangue corados com Giemsa e outras preparações a partir de animais clinicamente infectados, durante a fase aguda da doença. Ele não é recomendado para a detecção de animais pré-sintomáticos ou crônicos devido a sua baixa sensibilidade. Nos casos crônicos a infecção pode ser confirmada por métodos de detecção molecular. Vários testes sorológicos têm sido empregados para estudos epidemiológicos: teste de fixação do complemento (FC), ensaio de aglutinação capilar, teste de aglutinação em cartão (TAC), a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), bem como vários ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Os dois testes sorológicos atualmente mais indicados para identificar animais infectados são a ELISA de competição (cELISA) e o TAC (50). Testes baseados na detecção de ácidos nucleicos (PCR), também têm sido desenvolvidos, pois são capazes de detectar a presença de infecção de baixo nível em animais portadores e carrapatos vetores (18).

1.1.7 Tratamento e profilaxia

No Brasil, para o tratamento da anaplasmoze, três drogas são geralmente utilizadas: oxitetraciclina, dipropionato de imidocarb e enrofloxacina. A oxitetraciclina é amplamente utilizada no Brasil, sendo ainda o medicamento de eleição para o tratamento da anaplasmoze, por sua ação rápida e considerável efeito residual (51). Gotze *et al.* (52) comprovaram a

eficiência da oxitetraciclina, na dose de 20 mg/Kg, na recuperação do quadro clínico da anaplasmosse bovina em vacas leiteiras em produção. A terapia antimicrobiana é dirigida para a quimioprofilaxia (geralmente usada em animais aparentemente saudáveis durante o período de contato com o vetor para limitar os efeitos clínicos da infecção) e no tratamento da anaplasmosse clínica (em animais doentes). O tratamento não elimina com segurança infecções persistentes e existem poucas evidências de que ele impeça os bovinos de se tornarem infectados com *A. marginale* (18). Nos EUA, há apenas dois compostos aprovados para uso contra *A. marginale*, a oxitetraciclina e a clortetraciclina. As tetraciclinas são antibióticos bacteriostáticos que inibem a síntese de proteínas por ligação reversível com subunidades ribossomais 30S de organismos suscetíveis (53). A atividade bacteriostática das tetraciclinas está associada com a inibição da síntese de proteínas, e parece ser dependente do tempo em que as concentrações de droga permanecem acima da concentração inibitória mínima (MIC) para o organismo alvo (54). Coetzee *et al.* (55) constataram que a oxitetraciclina produz pequenas mudanças na estrutura de *A. marginale* e é rickettsiostática. Portanto, uma resposta imune competente do hospedeiro seria necessária para a eliminação do patógeno.

A administração de tetraciclina é acompanhada por desvantagens de custo, períodos de descarte de carne e leite e o risco de desenvolvimento de resistência de *A. marginale* aos antimicrobianos (18,56). Brayton *et al.* (2) relataram a existência de bombas de efluxo em *A. marginale*, embora a resistência clínica a antibióticos não tenha sido relatada até agora (18,57), por isso o significado clínico ou a repercussão fisiológica da atividade destas bombas devem ainda ser analisados (18).

A enrofloxacin é um antibiótico bactericida de largo espectro que afeta o metabolismo do DNA bacteriano através das enzimas topoisomerase II e IV. A farmacocinética observada de enrofloxacin indica que altas concentrações plasmáticas são alcançadas em um curto período de tempo (58). Facury-Filho *et al.* (59) concluíram que a administração de uma dose única de enrofloxacin (7,5 mg/kg) foi eficaz para o tratamento agudo da anaplasmosse. A enrofloxacin foi mais eficaz do que a oxitetraciclina, devido ao seu melhor controle da infecção rickettsial e recuperação clínica mais rápida.

O imidocarb é um derivado do carbanilide com atividade anti-protozoários. O modo de ação do imidocarb é incerto, embora tenham sido propostos dois mecanismos: interferência com a produção e/ou utilização de poliaminas, ou a prevenção da entrada de inositol nos eritrócitos contendo o parasito (60). Roby & Mazzola (61) descobriram que duas injeções de dipropionato de imidocarb, na dose de 5 mg/kg, administradas com um intervalo de 14 dias, eliminaram *A. marginale* de animais portadores. Em um segundo relato, dipropionato de imidocarb administrado em duas doses de 5 mg/kg, com 7 dias de intervalo, eliminou a infecção persistente em um entre quatro terneiros infectados (62).

As estratégias de profilaxia da anaplasmosse envolvem basicamente o controle dos vetores e o controle do agente, por imunizações ou uso de quimioprofiláticos, baseados na utilização de drogas específicas contra os agentes causadores da doença (63). Subdoses de tetraciclina e imidocarb são utilizadas na quimioprofilaxia. Tetraciclina é utilizada em 2 a 4 aplicações em subdoses (2-4 mg/kg), pela via Intramuscular (IM), em intervalos de 21 em 21 dias. O imidocarb é empregado na dosagem de 1 a 2 mg/kg (64). As subdoses quimioterápicas permitirão ao animal adquirir a infecção sem sinais clínicos ou com sinais brandos, mas podem favorecer o surgimento de microrganismos resistentes aos fármacos utilizados.

Anaplasma marginale subsp. *centrale* foi a primeira vacina viva utilizada para proteger contra uma doença rickettsial e ainda está em uso generalizado um século depois de seu desenvolvimento (65). *A. centrale* foi isolado por Sir Arnold Theiler no início de 1900 e é atualmente a cepa da vacina viva mais amplamente utilizada para o controle da anaplasnose bovina (1,66). Theiler observou que *A. centrale* foi menos patogênica para os bovinos do que *A. marginale* e que os bovinos infectados com *A. centrale* desenvolviam imunidade protetora contra a infecção por *A. marginale* (65,66). Estes resultados levaram diretamente para o uso deste organismo como uma vacina viva para prevenir a alta morbidade e mortalidade devido à anaplasnose (65–67). Inicialmente implantado na África do Sul, o uso desta vacina viva se propagou durante o século 20 para os países tropicais e subtropicais, em toda a África e na Ásia, Austrália e América Latina (incluindo o Brasil) e continua em uso (65,68). No Brasil, o uso de *A. centrale* como vacina foi e ainda é mais prevalente no Rio Grande do Sul. Na Austrália, historicamente, cerca de um milhão de doses da vacina são utilizadas anualmente (65,68).

1.1.8 Proteínas de Superfície Principais

As Proteínas de Superfície Principais (MSPs) desempenham um papel crucial na interação de *A. marginale* com células do hospedeiro e, portanto, têm relação com a sua capacidade para causar infecção. Seis MSPs foram identificadas em *A. marginale* infectando eritrócitos bovinos (18,69) e demonstrou-se serem conservadas na fase de vida no interior de carrapatos e culturas de células derivadas desses organismos (18,70). Três destas MSPs, nomeadamente MSP1a, MSP4 e MSP5, são codificadas por genes individuais e não variam antigenicamente em cada cepa, enquanto as outras três, MSP1b, MSP2 e MSP3, são

codificadas por famílias multigênicas e podem variar antigenicamente, principalmente em bovinos persistentemente infectados (18,70).

A superfamília *mSP2* contém 56 membros, incluindo 16 pseudogenes e a superfamília *mSP1* contém nove membros (2). A superfamília *mSP2* é construída em torno de *mSP2*, *mSP3* e *mSP4*. MSP2, MSP3, e MSP4 estão presentes na membrana externa com domínios expostos na superfície. Além disso, há sete pseudogenes funcionais para *mSP2* e sete pseudogenes funcionais para *mSP3* na cepa St. Maries (2). MSP4 é conservada entre cepas de *Anaplasma marginale*, tanto em nível de proteína quanto de DNA (71). Fazem parte da superfamília *mSP1* os genes que codificam a proteína MSP1, um complexo heteromérico de superfície exposta consistindo de MSP1a e MSP1b. MSP1a e MSP1b têm funções de adesinas em corpúsculos iniciais de *A. marginale*, provavelmente durante a invasão de eritrócitos (72). O *mSP1a* é um gene de cópia única e exibe diferenças entre as cepas causadas por sequências variáveis e número de unidades de repetições em tandem de 86-89 pb de comprimento. MSP1b, por outro lado, é codificada por uma pequena família (*mSP1β*) de cinco genes, sendo dois apresentando sequências de tamanho completo e três parciais (73). Os genes parciais podem ser pseudogenes funcionais que permitem a variação antigênica de MSP1b, mas isto ainda não foi demonstrado (2).

As proteínas das superfamílias *mSP2* e *mSP1* representam uma proporção significativa das moléculas esperadas na superfície do organismo. MSP1, MSP2 e MSP3 são moléculas imunodominantes contra as quais a maior parte da resposta imune do hospedeiro é direcionada (74–77). A infecção persistente é mantida por meio de variação antigênica de MSP2 e MSP3, permitindo que o organismo evada a resposta imune do hospedeiro. Brayton et al., (78) demonstraram que existe comutação simultânea de variantes MSP2 e MSP3

durante a infecção, e a capacidade destas duas moléculas para trabalhar em conjunto podem servir para amplificar a diversidade antigênica do revestimento de superfície e aumentar o repertório utilizado para evadir a resposta imune do hospedeiro (2).

O gene *msp5* é considerada uma boa ferramenta para a detecção molecular, devido ao seu alto valor de conservação na espécie *A. marginale*. A MSP5 é uma proteína de 19-kDa, altamente conservada, codificada por uma única cópia do gene de 633 pb no genoma de *A. marginale*. Ele tem sido utilizado em vários estudos de detecção utilizando diferentes conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores (79,80).

1.1.9 Genomas

Com o sequenciamento e anotação do genoma completo de 1.197.687 pb da cepa St. Maries de *A. marginale*, Brayton *et al.*, (2) mostraram que o revestimento da superfície é dominado pelas superfamílias *msp1* e *msp2*. Das 949 sequências codificantes (CDs) anotadas, apenas 62 são previstas para serem proteínas da membrana externa, e destas, 49 pertencem a uma destas duas superfamílias. O genoma contém pseudogenes funcionais incomuns que pertencem à superfamília *msp2* e desempenham um papel integral na variação antigênica do revestimento de superfície, e são, portanto, distintamente diferentes de pseudogenes descritos como subprodutos da evolução reductiva em outras Rickettsiales.

Dark *et al.*, (81) determinaram a sequência completa do genoma da cepa Florida de *A. marginale*, e as sequências quase completas de três cepas adicionais (Puerto Rico, Virginia e Mississippi) para análise comparativa com o genoma da cepa St. Maries. O genoma da cepa Florida é composto por um único cromossomo circular de 1.202.435 pb previsto para conter 942 CDs. A análise comparativa revelou que *A. marginale* tem um genoma de núcleo fechado

com algumas regiões altamente variáveis, que incluem os genes *msp2* e *msp3*, assim como o locus *aaap*. A comparação de várias cepas de *A. marginale* sugere que estas bactérias intracelulares têm taxas de retenção de SNP mais variáveis do que previamente relatado, e podem ter genomas de núcleo fechado em resposta ao ambiente do organismo hospedeiro e/ou evolução reductiva.

Herndon *et al.*, (2010) sequenciaram o genoma de *A. centrale* e compararam com os genomas de cepas virulentas de *A. marginale stricto sensu*. O genoma contém 1.206.806 pb e há 925 CDs, 19 pseudogenes, 37 genes tRNA, e um único conjunto de genes rRNA no genoma. *A. centrale* contém 10 genes putativos não encontrados nos genomas de cepas de *A. marginale*. Da mesma forma, 18 genes encontrados em cepas de *A. marginale* estão ausentes em *A. centrale*. Ao excluir os genes que não têm homólogos na cepa vacinal e os genes altamente variáveis *msp2* e *msp3*, o número de candidatos a antígenos vacinais é reduzido para seis: quatro membros da superfamília *msp2* (*msp4*, *Omp1*, *Omp7* e *Opag2*) e dois não membros de superfamílias (AM779/ACIS557 e AM854/ACIS486).

Dark *et al.*, (82), utilizando sequenciamento de genoma de alto rendimento, definiram o nível de conservação dos diferentes membros da família *pfam01617* em dez cepas de *A. marginale* dos EUA e também na cepa vacinal viva relacionada *A. centrale*. Estes dados mostram maior número de SNPs em *A. centrale* quando comparado com todas as cepas de *A. marginale* norte-americanas. Foi definido um catálogo de 19 antígenos conservados que podem ser adequados para o desenvolvimento de uma vacina recombinante multicomponente.

Pierlé *et al.*, (83) relataram as primeiras sequências do genoma e análise comparativa de cepas australianas que diferem na virulência e transmissibilidade. Os genomas das cepas

Gypsy Plains (virulenta e transmitida por carrapatos) e Dawn (menos virulenta e não transmissível por carrapatos) com uma cobertura de 74x e 23x, respectivamente, foram sequenciados. Uma lista de diferenças genéticas que segregam com o fenótipo foi avaliada para a capacidade de distinguir a cepa atenuada a partir de cepas de campo virulentas. Um INDEL de 1194 bp que abrangeu um gene inteiro, AM415, estava ausente na cepa Dawn, mas presente na cepa Gypsy Plains. Dois grandes INDELS intimamente posicionados foram encontrados na cepa Dawn nas posições 1090143-1090469 e 1090890-1091782, com 327 e 893 pb de comprimento, respectivamente. Na cepa Gypsy Plains um único INDEL de 791 pb foi encontrado nesta região entre as posições 1.091.010-1091800. Estes INDELS englobam partes da fase de leitura aberta (ORF) de dois genes que codificam para as proteínas da membrana externa relacionadas: *omp8* e *omp9*. A análise de SNPs mostrou uma impressionante redução da diversidade genética entre essas cepas, com o menor número de SNPs detectados entre quaisquer duas cepas de *A. marginale*. A comparação do genoma completo entre as cepas Dawn, Gypsy Plains e St. Maries identificou 10.008 SNPs, sendo que 195 dessas variantes foram únicas da cepa Dawn ou Gypsy Plains. Noventa e sete SNPs foram únicos para a cepa Gypsy Plains, ao passo que 98 foram exclusivas para a cepa Dawn. As análises filogenéticas utilizando as cepas australianas revelaram uma maior distância evolutiva comparativamente às cepas sequenciadas anteriormente.

1.1.10 Marcadores Filogenéticos

As MSPs de *A. marginale* estão envolvidas em interações do parasito com ambos hospedeiros, vertebrados e invertebrados (2,3,47,70,84,85). Por isso, estes genes são submetidos à pressões seletivas exercidas pelos dois diferentes sistemas imunes dos

hospedeiros (1). Em um estudo sobre a filogeografia de isolados de *A. marginale* do Novo Mundo, de la Fuente *et al.* (86) utilizaram sequências dos genes *msp1a* e *msp4* de isolados da Argentina, Brasil, México e Estados Unidos, sendo possível averiguar que as sequências de DNA e de aminoácidos deduzidas para MSP4 apresentaram variação suficiente para detectar padrões filogeográficos em larga escala. Estes resultados sugerem que *msp4* é um marcador útil para elucidar os padrões filogeográficos e as relações filogenéticas entre isolados de *A. marginale*. Em contraste com os resultados obtidos com *msp4*, as sequências de DNA e de aminoácidos deduzidas de *msp1a* falharam ao fornecer a resolução ou os padrões filogeográficos de isolados de *A. marginale*. Apesar da falta de resolução filogenética, os autores concluíram que *msp1a* poderia ser um gene adequado para estes estudos, mas estudos posteriores utilizando *msp1a* deveriam incluir uma amostra de tamanho maior de isolados de *A. marginale* a partir de uma área geográfica menor do que o utilizado no estudo. Cabe ressaltar que nesse estudo foram analisadas as sequências de apenas um isolado brasileiro, oriundo de Minas Gerais. Em outro trabalho, de la Fuente *et al.* (87) analisaram cepas de *A. marginale* de diferentes regiões (América do Norte e do Sul, Europa, Ásia, África e Austrália) utilizando sequências de repetições em tandem de MSP1a. Foram caracterizadas 131 cepas de *A. marginale* com 79 sequências de repetição em tandem MSP1a. Estes resultados confirmam a heterogeneidade genética de cepas de *A. marginale* nas regiões endêmicas em todo o mundo. As análises filogenéticas de sequências de repetição em tandem de MSP1a não resultaram em grupos de acordo com a origem geográfica das cepas de *A. marginale*, mas 78% das sequências repetidas MSP1a estavam presentes em cepas de uma mesma região geográfica. Significativas evidências para *clusters* contendo sequências das cepas italianas, espanholas, chinesas, e sul-americanas foram demonstradas. As análises

filogenéticas de sequências repetidas MSP1a sugeriram coevolução da bactéria com carrapatos e forneceram provas de múltiplas introduções de linhagens de *A. marginale* de diferentes localizações geográficas em todo o mundo.

Alamzán *et al.* (88), estudando um surto de anaplasrose em uma fazenda que fica em uma área endêmica no estado de Tamaulipas, no México, através da análise das sequências de *mSP4* e *mSP1a*, averiguaram que vários genótipos de *A. marginale* estão presentes em bovinos durante surtos de anaplasrose aguda. Desta forma, sugere-se que a transmissão mecânica ou transmissão biológica, por meio de eventos igualmente eficientes de transmissão independentes podem explicar a frequência dos genótipos de *A. marginale* em um rebanho bovino durante os surtos de anaplasrose bovina aguda em áreas endêmicas.

Ybañez *et al.* (89) realizaram o primeiro estudo de detecção molecular e caracterização de *A. marginale* em bovinos e *R.(B.) microplus* em Cebu, Filipinas, utilizando cinco marcadores para análise filogenética (*rRNA 16S*, *mSP5*, *mSP1a*, *gltA* e *groEL*). Atualmente, a reconstrução de genealogias entre procariontes baseia-se principalmente na análise comparativa das sequências de genes de *rRNA 16S*. A taxonomia e identificação microbiana têm se beneficiado significativamente destes desenvolvimentos, ao ponto que a classificação atual reflete suas relações genealógicas (90). Apesar do fato de outros marcadores funcionais conservados poderem proporcionar uma resolução taxonômica semelhante ou mesmo superior (91), as bases de dados de genes de *rRNA 16S/18S* (subunidade pequena, SSU) ultrapassam por uma ordem de magnitude qualquer outro gene e abrangem a maior cobertura de sequências até mesmo em nível de gênero (92). Métodos moleculares baseados no *operon* do gene de choque térmico (*groEL*) são comumente utilizados para a detecção de organismos do gênero *Anaplasma*. A *groEL* é uma chaperonina

e pode ser encontrada em numerosas bactérias (93), apresentando a vantagem de ter mais variações entre espécies do que o gene de *rRNA 16S* (89,94), completando a maioria dos resultados das árvores filogenéticas criadas a partir de *rRNA 16S* (89,94,95).

Cabezas-Cruz *et al.* (96) propuseram uma nomenclatura para a classificação de cepas de *A. marginale* baseada em MSP1a. Todas as repetições em tandem entre cepas de *A. marginale* foram classificadas (figura 4) e a variabilidade e frequência dos aminoácidos em cada posição foi determinada. A variação da sequência de epítomos de células B imunodominantes foi determinada e a estrutura secundária (2D) das repetições em tandem foi modelada. Um total de 224 diferentes cepas de *A. marginale* foram classificadas, mostrando 11 genótipos com base no microsatélite 5'-UTR e 193 diferentes repetições em tandem com alta variabilidade de aminoácidos por posição. Os resultados desse trabalho mostraram correlação filogenética entre sequências de MSP1a, estrutura secundária, composição de epítomos de células B e transmissibilidade das cepas de *A. marginale* por carrapatos.

Strain Name	Accession No. / Reference	Tandem repeat structure	No. Tandem repeats
Argentina/Chaco/ - ($\alpha, \beta, \Gamma^2, \beta^2, \Gamma$)	DQ833264	α β Γ Γ β β Γ	7
Argentina/Chaco/ - ($\tau, 11, 10^2, 11, 10, 15$)	DQ833266	τ 11 10 10 11 10 15	7
Argentina/Chaco/ - ($\tau, 22, 13, 18$)	DQ833263	τ 22 13 18	4
Argentina/Cordoba/ - (23, 24, 25, 26, 27 ²)	DQ833261	23 24 25 26 27 27	6
Argentina/Corrientes/ - (53, 10 ²)	DQ833273	53 10 10	3
Argentina/Corrientes/ - (48, 11, 10)	DQ833274	48 11 10	3
Argentina/Corrientes/ - ($\alpha, 49, 50, 51, 52$)	DQ833275	α 49 50 51 52	5
Argentina/Corrientes/ - (α, β^3)	DQ833272	α β β β	4
Argentina/Entre Rios/ - (F, M ²)	DQ833249	F M M	3
Argentina/Mercedes/ - (23, 30, 31 ³)	DQ833271	23 30 31 31 31	5
Argentina/Quitilipi/ - (28, 29, M, 29, M, F)	DQ833270	28 29 M 29 M F	6
Argentina/Salta/ G - (B ² , M)	AF428093	B B M	3
Argentina/Santa Fe/ - (α, β^3, Γ)	DQ833253	α β β β Γ	5
Argentina/Virasoro/E - (Σ, B, Q, B, C)	AF428094	Σ B Q B C	5
Australia/Northern Territory/ J - (8)	AF407542	8	1
Australia/Western Australia/ E - (8)	AF407545	8	1
Brazil/Minas Gerais/ B - (13, 27 ²)	JX844209	13 27 27 27	4
Brazil/Minas Gerais/ C - (α, β, τ, M)	AY283199	α β τ M	4
Brazil/Minas Gerais/ D - (72, 62, 61)	JX844216	72 62 61	3
Brazil/Minas Gerais/ D - (C, F, N)	AY283198	C F N	3
Brazil/Minas Gerais/ E - (13, 159 ²)	Bastos et al.2010	13 159 159	3
Brazil/Minas Gerais/ E - (72, 62, 61)	JX844210	72 62 61	3
Brazil/Minas Gerais/ E - (78, 24 ² , 25, 31)	JX844206	78 24 24 25 31	5
Brazil/Minas Gerais/ E - ($\alpha, \beta^2, 13$)	JX844215	α β β 13	4
Brazil/Minas Gerais/ E - (α, β^2, N)	AY283200	α β β N	4

Figura 4: Exemplos de classificação de cepas de *A. marginale* baseada em seqüências e número de repetições em tandem da proteína MSP1a. Fonte: Cabezas-Cruz *et al.*(96).

1.2 Justificativa

No Brasil, a vacina viva contra anaplasnose é produzida em escala experimental, não atendendo a demanda existente nas cadeias produtivas de bovinos. No Rio Grande do Sul, por ser uma área de instabilidade enzoótica, onde a taxa de transmissão não é suficiente para imunizar a maioria dos terneiros sensíveis antes da perda da imunidade materna em determinadas épocas do ano, a demanda por vacinas é ainda maior. O Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), órgão vinculado à Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio do Estado do RS produziu há mais de vinte anos uma vacina viva a base de *A. centrale* contra a anaplasnose bovina, a qual foi comercializada entre 1995 e 2010. Entretanto, desde 2010 a vacina não é comercializada devido a restrições do Ministério da Agricultura para produção de vacinas compostas por sangue de bovinos infectados, demandando novas pesquisas para fornecer tecnologias alternativas. Nesse sentido, a geração de conhecimento sobre as cepas virulentas e avirulentas e a identificação de genes associados a estes fenômenos tem fundamental importância. Surpreendentemente, não há informações sobre genomas de cepas brasileiras de *A. marginale*. Dessa forma, as informações existentes são, na sua maior parte, oriundas de cepas de outros países ou de trabalhos que fazem classificações filogenéticas com base na sequência parcial de genes isolados. Para suprir esta demanda e fornecer informações que gerem subsídios e conhecimento para novas tecnologias de prevenção da anaplasnose bovina é necessária informação mais aprofundada sobre os genes envolvidos no processo de virulência para as cepas locais e polimorfismos com importância regional. Até o momento, esta ausência de informações nos dificulta aprofundar a busca por outras alternativas, como vacinas recombinantes.

Esta dissertação busca gerar as primeiras informações de genomas de isolados brasileiros de *A. marginale*, o que tem impacto direto tanto em estudos básicos como aplicados. Considerando o impacto causado pela anaplasmoze bovina no estado do Rio Grande do Sul, a indisponibilidade de vacinas comerciais e a ausência de informações abrangentes de genômica sobre as amostras locais, este estudo pode lançar novas bases conceituais de pesquisa molecular, genética, epidemiológica e imunológica para desenvolver novas alternativas visando diminuir os prejuízos à produção primária brasileira. Acreditamos que este estudo vem ao encontro das políticas prioritárias para diminuir gargalos na produção primária brasileira e acelerar o desenvolvimento. Cabe ressaltar a questão estratégica da realização de tal estudo no Rio Grande do Sul, estado onde a anaplasmoze bovina apresenta-se com características epidemiológicas marcadamente diferentes das demais regiões do Brasil, com diversas regiões de instabilidade enzoótica e altos índices de mortalidade por essa enfermidade.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Realizar o sequenciamento e disponibilizar o genoma de cepas brasileiras de *Anaplasma marginale* e compará-los com genomas já sequenciados de cepas de outros países.

1.3.2 Objetivos Específicos

1.3.2.1 Sequenciar e anotar o genoma de cepas brasileiras de *A. marginale*.

1.3.2.2 Pesquisar polimorfismos (SNPs e INDELS) nos genomas das cepas brasileiras comparando-os com genomas de cepas referência de outros países.

Capítulo 2

Artigo Científico

Genomic characterization indicates high variability between Brazilian strains of *Anaplasma marginale*

Artigo científico submetido ao periódico científico *Ticks and Tick-borne Diseases* publicado pela Elsevier.

Fator de impacto: 2.690

Guia dos autores: <https://www.elsevier.com/journals/ticks-and-tick-borne-diseases/1877-959x/guide-for-authors>

De: "Ticks and Tick Borne Diseases" <ttbdis@elsevier.com>

Data: 20 de out de 2016 8:15 PM

Assunto: Submission Confirmation

Para: <jose.reck@gmail.com>

Cc:

Re: Genomic characterization indicates high variability between Brazilian strains of *Anaplasma marginale* by Bruno Dall'Agnol, DVM; Anelise Webster, DVM, MSc; Ugo A Souza, DVM, MSc; Fabiana Q Mayer, PhD; Guilherme M Klafke, PhD; Tatiana T Torres, PhD; Sirlei Daffre, PhD; Rosangela Z Machado, PhD; João Ricardo Martins, PhD; Carlos Alexandre S Ferreira, PhD; Jose Reck, DVM, PhD
Research paper

Dear Dr. Jose Reck,

We have received your article "Genomic characterization indicates high variability between Brazilian strains of *Anaplasma marginale*" for consideration for publication in Ticks and Tick-Borne Diseases.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/ttbdis/>

2. Enter these login details.

Your username is: jreck

If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

3. Click [Author Login]

This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Ticks and Tick-Borne Diseases

Capítulo 3

Considerações Finais

3.1 Considerações Finais

A anaplasmoze bovina tem sido um problema para a pecuária brasileira principalmente em áreas de instabilidade enzoótica, onde a manifestação clínica da doença é mais frequente, mas também nas áreas livres de *A. marginale*, pois a comercialização de bovinos dessas áreas para áreas endêmicas se torna difícil devido à ausência de imunidade adquirida desses animais, o que dificulta o interesse dos produtores, especialmente com relação a animais reprodutores. Grande parte desse problema se deve ao fato de não existir uma vacina comercial que confira uma imunidade eficaz contra cepas heterólogas de *A. marginale* que apresente níveis de biossegurança adequados. Dessa forma, é importante o desenvolvimento de uma nova vacina mais eficiente e segura. No entanto, antes disso são necessários mais conhecimentos básicos sobre quais genes/proteínas da riquetsia estão envolvidas com a resposta imune nos bovinos e qual a diversidade destas nas diferentes cepas distribuídas ao redor do globo. Embora o conhecimento existente sobre essa bactéria que causa tantos prejuízos a pecuária mundial seja grande, ainda existem várias lacunas a serem preenchidas para que possamos desenvolver uma vacina eficiente. Uma dessas lacunas é o conhecimento da diversidade genética de cepas de *A. marginale*. Uma maneira de estudar essa diversidade é através do conhecimento e estudo do genoma de *A. marginale* e da comparação entre os genomas de diferentes cepas. Até o momento não tínhamos informações sobre sequências do genoma de cepas de *A. marginale* sul-americanas. Com a difusão e disponibilização das técnicas de sequenciamento de alto desempenho espera-se que essa situação se altere e possamos em breve aumentar o conhecimento sobre a diversidade genômica da *A. marginale*.

A descoberta de *A. centrale* por Theiler no início de 1900 proporcionou um grande avanço na prevenção da anaplasmoze bovina. A cepa Israel de *A. centrale* foi propagada em vários países do hemisfério sul, incluindo o Brasil. Em nosso país ela vem sendo utilizada com sucesso, em escala experimental, há mais de 50 anos e mantida por sucessivas passagens em bovinos. Porém a vacina apresenta alguns limitantes como: (i) ser produzida a partir de sangue de bovinos inoculados com *A. centrale*, o que representa um risco em termos de transmissão de outros microrganismos do bovino doador para os bovinos imunizados, (ii) necessitar ser mantida criopreservada em nitrogênio líquido quando não utilizada logo após sua produção, (iii) a falta de conhecimento sobre o nível de proteção contra cepas heterólogas de *A. marginale sensu stricto* de diferentes origens e virulência e (iv) por tratar-se de uma vacina viva que utiliza uma subespécie naturalmente menos virulenta para bovinos, a vacinação (infecção) com *A. centrale* pode provocar efeitos clínicos indesejáveis.

Esta dissertação apresenta os primeiros genomas das cepas da América do Sul de *A. marginale*. Foi possível determinar que genomas de duas cepas de *A. marginale* da América do Sul (Palmeira e Jaboticabal) apresentaram maior diversidade entre elas do que já havia sido encontrado para cepas do mesmo país. A análise do polimorfismo revelou uma maior variação nas cepas Palmeira e Jaboticabal em relação aos genomas de cepas norte-americanas (Flórida e St. Maries) do que em relação aos genomas de cepas australianas (Gypsy Plains e Dawn). Esses resultados sugerem, considerando a informação genômica, que as cepas brasileiras não seriam parte de um grupo americano juntamente com cepas norte-americanas mas, pelo contrário, estão mais relacionadas com as cepas australianas. Estes dados contribuem para a compreensão das relações evolutivas das cepas de *A. marginale*, e servirão de referência, juntamente com demais sequências para que possamos aumentar o

conhecimento do pangenoma de *A. marginale* e de sua diversidade. Os avanços gerados com esses estudos são subsídios tanto para o avanço da ciência básica, como dão suporte para o planejamento de pesquisas aplicadas e para tomada de decisões referentes a projetos de controle e prevenção. Nesse contexto, espera-se que o conjunto dos dados desta dissertação forneça não somente novos subsídios, mas também gere novas hipóteses, contribuindo no avanço e compreensão dos fatores que determinam as peculiaridades evolutivas e biológicas de *A. marginale*.

Referências Bibliográficas

1. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing S a. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol*. 2010;167(2-4):95–107.
2. Brayton K a, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, et al. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(3):844–9.
3. Kocan KM, De La Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia JC. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host–pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology*. 2004;129(7):S285–300.
4. Kocan KM, de la Fuente J, Guglielmone AA, Mele RD. Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. 2003;16(4):698–712.
5. Goodger, W.J., Carpenter, T., Riemann, H. Estimation of economic loss associated with Anaplasmosis in California beef cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 1979;174(12):1333–6.
6. Alderink, F.J., Dietrick, R.A. Economic and epidemiological implications of anaplasmosis in Texas cattle herds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America National Academy of Sciences of the United States of America of the 86th Annual Meeting of the United States Animal Health Association*. 1982. p. 66–75.
7. Suarez CE, Noh S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet Parasitol*. 2011;180(1-2):109–25.
8. McCosker PJ. The global importance of babesiosis. In: Ristic, M.; Kreier P. J, editor. *Babesiosis*. New York: New York: Academic Press; 1981. p. 1–24.
9. Grisi L, Leite RC, Martins JRDS, Barros ATM De, Andreotti R, Cançado PHD, et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2014;23:150–6.
10. Grisi L et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*. 2002;21(125):8–10.
11. BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Sanitária Animal. Carrapato, berne e bicheira no Brasil. Brasília, DF; 1984. p. 153.

12. Vieira MIB, Severo A. Impacto econômico da Tristeza Parasitária Bovina na região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *A Hora Veterinária*. 2007;27(160):32–4.
13. Spath EJA, Guglielmone AA, Signorini AR, Mangold AJ. Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. *Therios*. 1994;23(118):454–68.
14. OIE (Office International des Epizooties Web Site). Bovine Anaplasmosis [Internet]. Terrestrial Animal Health Code. 2003. p. Chapter 2.3.7. Available from: <http://www.oie.int/eng/normes/mcode/>
15. Kuttler KL. Anaplasma infections in wild and domestic ruminants : a review. *Journal of Wildlife Diseases*. 1984;20(1):12-20.
16. Zaugg JL, Goff WL, Foreyt W, Hunter DL. Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *A. ovis*. *J Wildl Dis*. 1996;32:63–6.
17. Davidson WR, Goff WL. Anaplasmosis. In: Williams ES, Barker IK, editors. *Infectious Diseases of Wild Mammals*. Ames, IA, USA: Iowa State University Press; 2001. p. 455–66.
18. Aubry P, Geale DW. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis*. 2011;58(1):1–30.
19. Silveira J a G, Rabelo EML, Lacerda ACR, Borges P a L, Tomás WM, Pellegrin AO, et al. Molecular detection and identification of hemoparasites in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) from the Pantanal Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*. Elsevier GmbH.; 2013;4(4):341–5.
20. Silveira J a G, Rabelo EML, Ribeiro MFB. Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). *Transbound Emerg Dis*. 2012;59(4):353–60.
21. Ristic M. Bovine anaplasmosis. In: Kreier J, editor. *Parasitic Protozoa*. 4th ed. New York: Academic Press; 1977. p. 235–49.
22. Martins JR, Corrêa BL. Babesiose e Anaplasmosose Bovina: Aspectos destas enfermidades. *Pesqui Agropecuária Gaúcha*. 1995;1(1):51–8.
23. Dikmans G. Transmission of anaplasmosis. *Am J Vet Res*. 1950;11:5–16.

24. Ewing SA. Transmission of *Anaplasma marginale* by arthropods. In: Hidalgo RJ, Jones EW, editors. Proc 7th Nat Anaplasmosis Conf., Mississippi State University, MS; 1981. p. 395–423.
25. Stich RW, Kocan KM, Palmer GH, Ewing SA, Hair JA, Barron SJ. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* (Theiler) by *Dermacentor variabilis* (Say). Am J Vet Res. 1989;50:1386–91.
26. Kessler RH. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. Pesqui Veterinária Bras. 2001;21(4):177–9.
27. Foil LD. Tabanids as vectors of disease agents. Parasitol Today. 1989;5(3):88–96.
28. Potgieter FT. Epizootiology and control of anaplasmosis in South Africa. J S Afr Vet Assoc. 1979;504:367–72.
29. Scoles GA, Broce AB, Lysyk TJ, Palmer GH. Relative efficiency of biological transmission of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) compared with mechanical transmission by *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). J Med Entomol. 2005;42:668–75.
30. Coronado A. Is *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*? Revista Científica, FCV-LUZ; 2001. p. 408–11.
31. Figueroa JV, Alvarez JA, Ramos JA, Rojas EE, Santiago C, Mosqueda JJ, et al. Bovine babesiosis and anaplasmosis follow-up on cattle relocated in an endemic area for hemoparasitic diseases. Ann NY Acad Sci. 1998;849:1–10.
32. Zaugg JL. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. Am J Vet Res. 1985;46:570–2.
33. Potgieter FT, Van Rensburg L. The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies in incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. Onderstepoort J Vet Res. 1987;54:557–60.
34. Salabarría FF, Pino R. Vertical transmission of *Anaplasma marginale* in cows affected in late pregnancy. Rev Cuba Ciencias Vet. 1988;19:179–82.
35. Grau HEG, Cunha Filho NA Da, Pappen FG, Farias NADR. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2013;22(2):189–93.
36. Richey EJ. Bovine anaplasmosis. In: Howard RJ, editor. Current Veterinary Therapy Food Animal Practice. Philadelphia: The W.B. Saunders Co.; 1981. p. 767–72.

37. French DM, McElwain TF, McGuire TC, Palmer GH. Expression of *Anaplasma marginale* major surface protein 2 variants during persistent cyclic rickettsemia. *Infect Immun.* 1998;66(3):1200–7.
38. French DM, Brown WC, Palmer GH. Emergence of *Anaplasma marginale* antigenic variants during persistent rickettsemia. *Infect Immun.* 1999;67(11):5834–40.
39. Kieser ST, Eriks IS, Palmer GH. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect Immun.* 1990;58(4):1117–9.
40. Kocan KM. Development of *Anaplasma marginale* in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. In: Sauer JR, Hair JA, editors. *Morphology, Physiology and Behavioral Ecology of Ticks*. England: Ellis Horwood Ltd.; 1986. p. 472–505.
41. Kocan KM, Goff WL, Stiller D, Claypool PL, Edwards W, Ewing SA, et al. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible calves. *J Med Entomol.* 1992;29:657–68.
42. Kocan KM, Stiller D, Goff WL, Claypool PL, Edwards W, Ewing SA, et al. Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. *Am J Vet Res.* 1992;53:499–507.
43. Ge NL, Kocan KM, Blouin EF, Murphy GL. Developmental studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) infected as adults by using nonradioactive in situ hybridization and microscopy. *J Med Entomol.* 1996;33:911–20.
44. Guglielmone AA. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet Parasitol.* 1995;57:109–19.
45. McCallon BR. Prevalence and economic aspects of anaplasmosis. In: Jones EW, editor. *Proc 6th National Anaplasmosis Conference*. Las Vegas, NV; 1973. p. 1–3.
46. Mahoney DF, Ross DR. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust Vet J.* 1972;48(5):292–8.
47. De la Fuente J, Lew A, Lutz H, Meli ML, Hofmann-Lehmann R, Shkap V, et al. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Anim Heal Res Rev.* 2005;6(01):75–89.
48. Jonsson NN, Reid SW. Global climate change and vector borne diseases. *Veterinary Journal* (London, England: 1997). 2000;160(2):87–9.

49. Smith RD, Evans DE, Martins JR, Ceresér VH, Correa BL, Petraccia C, et al. Babesiosis (*Babesia bovis*) Stability in Unstable Environments. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;916:510–20.
50. OIE (World Organisation for Animal Health). Bovine Anaplasmosis. In: World Organisation for Animal Health, editor. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* 6th ed. Paris; 2008. p. 599–610.
51. Clark CR, Dowling PM. Pharmacokinetic comparison of two long-acting oxytetracycline formulations in cattle. *Annual American College of Veterinary Internal Medicine Forum.* Charlotte; 2003. p. 773.
52. Gotze MM, Nizoli LQ, Silva SS. Efeitos da oxitetraciclina na recomposição do hematócrito de vacas leiteiras durante surto de anaplasnose bovina. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2008;95:92–5.
53. Plumb DC. *Veterinary Drug Handbook.* Ames: Iowa State Press; 2002.
54. Scholar EM, Pratt WB. Bacteriostatic inhibitors of protein synthesis: tetracyclines. *The Antimicrobial Drugs Second Edition.* 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2000. p. 184–99.
55. Coetzee JF, Kocan KM, Higgins JJ, Apley MD, Jones DE. Ultrastructural and fluorochromatic changes of *Anaplasma marginale* exposed to oxytetracycline, imidocarb and enrofloxacin in short-term erythrocyte cultures. *Vet Microbiol.* 2009;136(1-2):45–53.
56. Kocan KM, Blouin EF, Barbet a F. Anaplasmosis control. Past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;916:501–9.
57. Blouin EF, Barbet a F, Yi J, Kocan KM, Saliki JT. Establishment and characterization of an Oklahoma isolate of *Anaplasma marginale* in cultured *Ixodes scapularis* cells. *Vet Parasitol.* 2000;87(4):301–13.
58. Kaartinen L, Pyorala S, Moilanen M, Raisanen S. Pharmacokinetics of enrofloxacin in newborn and one-week-old calves. *J Vet Pharmacol Ther.* 1997;20:479–82.
59. Facury-Filho EJ, de Carvalho AÚ, Ferreira PM, Moura MF, Apolinário BC, Santos LDPH, et al. Effectiveness of enrofloxacin for the treatment of experimentally-induced bovine anaplasmosis. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2012;21(1):32–6.
60. (EMA) European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Committee for Veterinary Medicinal Products. Imidocarb. Maximum Residue Limit (MRL) Summary Report (2) [Internet]. 2001. Available from: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/>

61. Roby TO, Mazzola V. Elimination of the Carrier State of Bovine Anaplasmosis with Imidocarb. *Am J Vet Res.* 1972;33(10):1931–3.
62. Coetzee JF, Apley MD, Kocan KM. Comparison of the efficacy of enrofloxacin, imidocarb, and oxytetracycline for clearance of persistent *Anaplasma marginale* infections in cattle. *Vet Ther.* 2006;7(4):347–60.
63. Nizoli LQ, Marmitt IVP, Biegelmeyer P, Motta, JF, dos Santos TRB, da Silva SS. Efeito quimioprolifático do diacetado de diminazeno (Ganaseg®) e oxitetraciclina (Talcin Max®) contra a Tristeza Parasitária subclínica na melhoria do ganho de peso em novilhos precoces para abate. *A Hora Veterinária.* 2012;31(186):17–20.
64. Gonçalves PM. Epidemiologia e controle da Tristeza Parasitária Bovina na região sudeste do Brasil. *Ciência Rural.* 2000;30(1):187–94.
65. Herndon DR, Ueti MW, Reif KE, Noh SM, Brayton K a, Agnes JT, et al. Identification of multilocus genetic heterogeneity in *Anaplasma marginale* subsp. *centrale* and its restriction following tick-borne transmission. *Infect Immun.* 2013;81(5):1852–8.
66. Theiler A. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle. Department of Agriculture of the Union of South Africa. 1911 p. 7–46.
67. Theiler A. Gallsickness of imported cattle and the protective inoculation against this disease. *Agric J Union South Africa.* 1912;3:7–46.
68. Bock R, De Vos A. Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust Vet J.* 2001;79:832–9.
69. Palmer GH, Rurangirwa FR, Kocan KM, Brown WC. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Parasitol Today.* 1999;15(7):281–6.
70. Kocan KM, de la Fuente J. Co-feeding studies of ticks infected with *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol.* 2003;112(4):295–305.
71. Oberle SM, Palmer GH, Barbet AF. Expression and immune recognition of the conserved MSP4 outer membrane protein of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun.* 1993;61(12):5245–51.
72. McGarey DJ, Barbet a. F, Palmer GH, McGuire TC, Allred DR. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: Major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect Immun.* 1994;62(10):4594–601.
73. Viseshakul N, Kamper S, Bowie M V, Barbet a F. Sequence and expression analysis of a surface antigen gene family of the rickettsia *Anaplasma marginale*. *Gene.* 2000;253:45–53.

74. Brown WC, Brayton KA, Styer CM, Palmer GH. The Hypervariable Region of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 (MSP2) Contains Multiple Immunodominant CD4⁺ T Lymphocyte Epitopes That Elicit Variant-Specific Proliferative and INF-gama Responses in MSP2 Vaccinates. *J Immunol.* 2003;170:3790–8.
75. Palmer GH, Eid G, Barbet AF, McGuire TC, McElwain TF. The Immunoprotective *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 Is Encoded by a Polymorphic Multigene Family. *Infect Immun.* 1994;62(9):3808–16.
76. Brown WC, McGuire TC, Zhu D, Lewin H a, Sosnow J, Palmer GH. Highly Conserved Regions of the Immunodominant Major Surface Protein 2 of the Genogroup II Ehtlichial Pathogen *Anaplasma marginale* Are Rich in Naturally Derived CD4⁺ T Lymphocyte Epitopes that Elicit Strong Recall Responses. *J Immunol.* 2001;166:1114–24.
77. Brown WC, Palmer GH, Lewin H a., McGuire TC. CD4⁺ T lymphocytes from calves immunized with *Anaplasma marginale* major surface protein 1 (MSP1), a heteromeric complex of MSP1a and MSP1b, preferentially recognize the MSP1a carboxyl terminus that is conserved among strains. *Infect Immun.* 2001;69(11):6853–62.
78. Brayton K a, Meeus PFM, Barbet AF, Palmer GH. Variation of the Immunodominant Outer Membrane *Anaplasma marginale*. 2003;71(11):6627–32.
79. Torioni de Echaide S, Knowles DP, Travis C, Palmer GH, Suarez CE, Mcelwain TF. 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. *J Clin Microbiol.* 1998;36(3):777–82.
80. Visser ES, McGuire TC, Palmer GH, Davis WC, Shkap V, Pipano E, et al. The *Anaplasma marginale* *msp5* gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect Immun.* 1992;60(12):5139–44.
81. Dark MJ, Herndon DR, Kappmeyer LS, Gonzales MP, Nordeen E, Palmer GH, et al. Conservation in the face of diversity: multistrain analysis of an intracellular bacterium. *BMC Genomics.* 2009;10:16.
82. Dark MJ, Al-Khedery B, Barbet AF. Multistrain genome analysis identifies candidate vaccine antigens of *Anaplasma marginale*. *Vaccine.* Elsevier Ltd; 2011;29(31):4923–32.
83. Pierlé SA, Rosshandler II, Kerudin AA, Sambono J, Lew-tabor A, Rolls P, et al. Genetic Diversity of Tick-Borne Rickettsial Pathogens; Insights Gained from Distant Strains. *Pathogens.* 2014;3:57–72.

84. De la Fuente J, Garcia-garcia JC, Blouin EF, Sergio D, García MA, Kocan KM. Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. Anim Heal Res Rev. 2001;2(2):163–73.
85. De la Fuente J, Bussche RA Van Den, Tulio M, Kocan KM. *Anaplasma marginale msp1a* Genotypes Evolved under Positive Selection Pressure but Are Not Markers for Geographic Isolates. J Clin Microbiol. 2003;41:1609–16.
86. De la Fuente J, Van Den Bussche R a, Garcia-Garcia JC, Rodríguez SD, García M a, Guglielmone A a, et al. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. Vet Microbiol. 2002;88(3):275–85.
87. De la Fuente J, Ruybal P, Mtshali MS, Naranjo V, Shuqing L, Mangold AJ, et al. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. Vet Microbiol. 2007;119(2-4):382–90.
88. Almazán C, Almazán C, Medrano C, Ortiz M, de la Fuente J. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from an outbreak of bovine anaplasmosis in an endemic area. Vet Parasitol. 2008;158(1-2):103–9.
89. Ybañez AP, Sivakumar T, Ybañez RHD, Ratilla JC, Perez ZO, Gabotero SR, et al. First Molecular Characterization of *Anaplasma marginale* in Cattle and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Ticks in Cebu, Philippines. J Vet Med Sci. 2013;75(1):27–36.
90. Garrity GM. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. New York: Springer; 2001.
91. Ludwig W. Molecular phylogeny of microorganisms: is rRNA still a useful marker? In: Oren A, Papke RT, editors. Molecular Phylogeny of Microorganisms. Caister Academic Press; 2010. p. 65–83.
92. Yarza P, Spröer C, Swiderski J, Mrotzek N, Spring S, Tindall BJ, et al. Sequencing orphan species initiative (SOS): Filling the gaps in the 16S rRNA gene sequence database for all species with validly published names. Syst Appl Microbiol. Elsevier GmbH.; 2013;36(1):69–73.
93. Zeilstra-ryalls J, Fayet O, Georgopoulos C. The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. Annu Rev Microbiol. 1991;45:301–25.
94. Inokuma H, Fujii K, Okuda M, Beaufils J, Raoult D, Onishi T, et al. Determination of the Nucleotide Sequences of Heat Shock Operon *groESL* and the Citrate Synthase Gene (*gltA*) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for Phylogenetic and Diagnostic Studies. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(5):1132–6.

95. Dumler JS, Barbet a F, Bekker CP, Dasch G a, Palmer GH, Ray SC, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:2145–65.
96. Cabezas-Cruz A, Passos LMF, Lis K, Kenneil R, Valdés JJ, Ferrolho J, et al. Functional and immunological relevance of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a sequence and structural analysis. *PLoS One*. 2013;8(6):e65243.